

Quantitative Kapillarelektrophorese- Massenspektrometrie – Untersuchung der Präzision mittels verschiedener Interner Standards

Vom Fachbereich für Chemie und Pharmazie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jens Ohnesorge
aus Mainz

1. Referent: Prof. Hermann Wätzig

2. Referent: Prof. Conrad Kunick

eingereicht am: 05.09.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.11.2005

Druck: 2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der des Fachbereichs für Chemie und Pharmazie, vertreten durch Prof. H. Wätzig, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ohnesorge, J., Sänger-van de Griend, C. & Wätzig, H. Quantification in capillary electrophoresis - mass spectrometry: Long- and short-term variance components and their compensation using internal standards. *Electrophoresis* 26: 2360-2375 (2005).

Ohnesorge, J., Neusüß, C. & Wätzig, H. Quantitation in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26: im Druck

Tagungsbeiträge

Ohnesorge, J., Sänger-van de Griend, C. & Wätzig, H. Long-term precision in capillary-electrophoresis-electrospray mass spectrometry. (Poster) 17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis, Salzburg (2004)

Ohnesorge, J., Sanger-van de Griend, C. & Wätzig, H. Long-term precision in capillary-electrophoresis-electrospray mass spectrometry. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Regensburg (2004)

Ohnesorge, J., Neusüß, C. & Wätzig, H. Precision and its optimization in capillary electrophoresis - mass spectrometry. (Vortrag) Jahrestagung der Fachgruppe Arzneimittelkontrolle und Pharmazeutische Analytik, Mainz (2005)

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig unter Anleitung von **Herrn Prof. H. Wätzig**, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Unterstützung und die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. C. Kunick** für die Übernahme des Korreferats.

Den Kollegen aus dem Arbeitskreis gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, besonders **Michael Graf** und **Udo Schepers** für die fachliche Unterstützung und Diskussionen, sowie **Phillip Hasemann** für das Korrekturlesen. Weiterhin danke ich **Simone Kohfeld** und **Bianca Berger** für die Fehlersuche in dieser Arbeit und, wie auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts, für das gute Arbeitsklima. **Dr. Johann Grünefeld** möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken.

Im Besonderen gilt mein Dank **Frank Roese** für die technische Unterstützung bei der Wartung der Instrumente.

Für die Möglichkeit das Massenspektrometer des Instituts für Lebensmittelchemie zu Verwenden danke ich **Herrn Prof. P. Winterhalter**, sowie **Dr. Silke Hildebrand** für die technische Unterstützung. **Dr. Ulrich Papke** und **Dr. Christian Neusüß** (Bruker-Daltronics) bin ich für die Starthilfe bei der Massenspektrometrie bzw. die Diskussionen über CE-MS ebenfalls sehr dankbar.

Zuletzt möchte ich den Mitarbeitern der Abteilung für Analytische Entwicklung von AstraZeneca, Södertälje, besonders **Dr. Cari Sängers-van de Griend**, **Anders Ek**, **Kristian Liivakant**, **Mattias Andersson**, **Dr. Astrid Arbin** und **Ulf Appelgren** für die Möglichkeit dort zu arbeiten, die freundliche Aufnahme und fachliche Unterstützung meinen Dank aussprechen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Symbole und Abkürzungen.....	
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
2 Kapillarelektrophorese.....	4
2.1 Instrumenteller Aufbau.....	4
2.1.1 Detektion.....	5
2.1.2 Kapillaren.....	6
2.2 Theoretische Grundlagen.....	6
2.2.1 Elektrophoretische Mobilität.....	6
2.2.2 Elektroosmotischer Fluss.....	8
2.2.3 Trennprinzip in der Kapillarelektrophorese.....	13
2.3 Leistungskriterien von kapillarelektrophoretischen Trennungen.....	14
2.3.1 Trennleistung.....	14
2.3.2 Selektivität / Trennfaktor.....	17
2.3.3 Auflösung.....	18
2.4 Probenaufgabe.....	18
3 Massenspektrometrie.....	21
3.1 Instrumenteller Aufbau.....	21
3.1.1 Ionenquelle / Ionisierung.....	21
3.1.1.1 Signalunterdrückung (ion suppression).....	26
3.1.2 Quadrupol-Analysator.....	28
3.1.3 Ionendetektor.....	31
4 Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie.....	32
4.1 Unterschiede im Geräteaufbau bei UV- und massensensitiver Detektion...	33
4.2 Interfacetypen zur Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie.....	33
4.3 Vor- und Nachteile der verschiedenen Interfacetypen.....	36

5	Methodenvalidierung	38
5.1	Definitionen	38
5.1.1	Validierung analytischer Methoden	38
5.1.2	Präzision	39
5.1.3	Signal-Rausch-Verhältnis	41
5.1.4	Linearität	43
5.2	Die statistische Beurteilung von Analysenergebnissen	43
5.2.1	F-Test	44
5.2.2	t -Test	45
5.2.3	Varianzkomponenten	47
5.3	Allgemeine Vorteile durch Verwendung Interner Standards	49
6	Methodenentwicklung zur Quantifizierung	52
6.1	Verbesserung der Trennleistung und Reproduzierbarkeit in der Kapillarelektrophorese	52
6.2	Erhöhung der Reproduzierbarkeit in der Kapillarelektrophorese- Massenspektrometrie	55
6.2.1	Hintergrundelektrolyt	55
6.2.2	Sheath liquid	57
6.2.3	Kapillare und weitere Parameter	59
6.2.4	Quantitative Aspekte bei der Datenauswertung	62
6.2.5	Schema zur Methodenentwicklung für quantitative Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie	62
7	Untersuchungen zu Präzision und Ionisierungsausbeute an einem Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie-System	64
7.1	Vorversuche / Vorüberlegungen	64
7.1.1	Entwicklung der Proben	64
7.1.2	Entwicklung der Hintergrundelektrolyten	67
7.1.3	Konditionierung und Äquilibrierung der Kapillaren	71
7.1.4	Entwicklung des sheath liquid	72
7.1.5	Parameter am Massenspektrometer	73
7.1.6	Entwicklung eines Kapillarpositionierungsverfahrens	73

7.1.7	Datenintegration und Datenauswertung.....	74
7.2	Versuche mit strukturfremdem Internen Standard (Probe I).....	76
7.2.1	Erhöhung der Präzision durch einen Internen Standard.....	77
7.2.2	Präzision der Peakflächen bei UV- und massenspektrometrischer Detektion.....	81
7.2.3	Einfluss des pH-Werts des Hintergrundelektrolyten auf Peakfläche und Präzision.....	84
7.2.3.1	Einfluss des pH-Werts auf die absolute Peakfläche.....	85
7.2.3.2	Einfluss des pH-Werts auf die Präzision der Peakfläche.....	86
7.2.4	Einfluss des Isopropanolgehaltes des Hintergrundelektrolyten auf Peakfläche und Präzision.....	91
7.2.5	Konzentrationsabhängigkeit von Peakfläche und Präzision.....	92
7.2.6	Präzision der Peakflächen nach Teilung der Messreihen.....	97
7.2.7	Präzision von Migrationszeit und Mobilität.....	100
7.2.7.1	Einfluss der Kapillarposition auf die Präzision der Migrationszeit.....	100
7.2.7.2	Einfluss von pH-Wert und Isopropanolzugabe auf die Präzision der Migrationszeit.....	101
7.3	Versuche mit isotoopenmarkiertem Internen Standard (Probe II).....	103
7.3.1	Einfluss des Hintergrundelektrolyten auf die Peakfläche	106
7.3.2	Einfluss des Hintergrundelektrolyten auf die Präzision der absoluten Peakflächen.....	109
7.3.3	Präzision der Peakflächen nach Teilung der Messreihen.....	110
7.3.4	Konzentrationsabhängigkeit der Präzision.....	112
7.3.5	Präzision nach der Quotientenbildung mit dem Internen Standard....	113
7.3.5.1	Alternative Berechnungen des Quotienten.....	114
7.3.5.2	Theoretische Überlegungen zu Variationsursachen Teil 1.....	118
7.3.6	Einfluss von Druck während der Trennung auf die Peakfläche und deren Präzision.....	119
7.4	Versuche mit strukturverwandtem Internen Standard (Probe III).....	122
7.4.1	Entwicklung der Probe.....	122
7.4.2	Zusammenfassung von Ergebnissen zur Erhöhung der Datenzahl...125	
7.4.3	Einfluss von Hintergrundelektrolyt und Druck während der Trennung auf die Peakfläche.....	129

7.4.4	Präzision mit strukturverwandtem Internen Standard und Vergleich mit den Ergebnissen von Probe I und II.....	130
7.4.5	Theoretische Überlegungen zu Variationsursachen Teil 2.....	131
7.5	Versuche mit der mehrfachen Injektion desselben Analyten (Probe IV & V).....	134
7.5.1	Entwicklung der Proben.....	134
7.5.2	Untersuchung der Präzision.....	135
7.5.3	Vergleich mit den Ergebnissen von Probe I – III.....	139
7.5.3.1	Resümee aus dem Vergleich.....	140
8	Einordnung der Ergebnisse in den Zusammenhang mit bereits veröffentlichten Daten.....	141
9	Zusammenfassung.....	156
10	Ausblick.....	161
11	Experimenteller Teil.....	163
11.1	Geräte und Software.....	163
11.2	Vorbereitung der Kapillaren.....	163
11.3	Herstellung des sheath liquid.....	164
11.4	Herstellung des Hintergrundelektrolyten.....	165
11.5	Herstellung der Proben.....	166
11.5.1	Probe I: Strukturfremder Interner Standard.....	166
11.5.2	Probe II: Isotopenmarkierter Interner Standard.....	167
11.5.3	Probe III: Strukturverwandter Interner Standard.....	167
11.5.4	Probe IV & V: Mehrfache Injektion desselben Analyten.....	167
11.6	Methoden.....	168
11.6.1	Spectraphoresis 1000 mit UV-Detektion.....	168
11.6.2	Hewlett Packard ^{3D} CE mit UV-Detektion und Hewlett Packard Series 1100 MSD G1946A Single Quadrupol Massenspektrometer.....	170
11.7	Positionierung der Kapillare.....	173
11.7.1	In der Kapillarkassette.....	173
11.7.2	Im Interface.....	174

12 Anhang.....	176
12.1 Pharmakologischer Hintergrund und Hinweise zum Umgang mit den verwendeten Substanzen.....	177
12.2 Übersichtstabellen.....	178
 13 Lebenslauf.....	 184
 14 Literaturverzeichnis.....	 185

Symbole und Abkürzungen

<u>Symbol</u>	<u>Bedeutung</u>	<u>Einheit</u>
A	Peakfläche	[FE]
A_i	Peakfläche des Internen Standards	[FE]
α	Irrtumswahrscheinlichkeit	---
α_D	Dissoziationsgrad des Analyten	---
$\alpha_{i,j}$	Trennfaktor zwischen (i) und (j)	---
β	Pufferkapazität	---
c_A	Konzentration des Protonendonators	[variabel]
c_B	Konzentration des Protonenakzeptors	[variabel]
c_{eki}	Probenkonz. nach elektrokin. Injektion	[g·m ⁻³]
c_r	Konzentration des Referenzstandards	[variabel]
c_s	Konzentration der Probe	[variabel]
$cnf(\bar{x})$	Vertrauensbereich des Mittelwerts	---
D_i	Diffusionskoeffizient von (i)	[m ² ·s ⁻¹]
d	Kapillarinneendurchmesser	[m]
F_{el}	elektrische Kraft	[N]
F_{re}	Reibungskraft	[N]
E	elektrische Feldstärke	[V·m ⁻¹]
e_o	Elementarladung (1,602·10 ⁻¹⁹)	[A·s]
ε	Dielektrizitätskonstante	[F·m ⁻¹]
$F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$ oder F_{tab}	tabellierter Wert für den F-Test	---
f_i	Korrekturfaktor	---
H	Peakhöhe	[mm]
H_0	Nullhypothese	---
h_n	Höhe des Rauschens	[mm]
η	Viskosität	[N·s·m ⁻²]
k	Boltzmann Konstante (1.380658·10 ⁻²³)	[J·K ⁻¹]
L	Gesamtkapillarlänge	[m]
l	effektive Kapillarlänge	[m]
μ	wahrer Mittelwert	---

$\mu_{act,i}$	tatsächliche Mobilität des Teilchens (i)	$[\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
$\mu_{eff,i}$	effektive Mobilität des Teilchens (i)	$[\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
μ_{eo}	Mobilität des EOF	$[\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
$\mu_{ep,i}$	absolute elektrophoretische Mobilität von (i)	$[\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
$\mu_{ges,i}$	Gesamtmobilität des Teilchens (i)	$[\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$
N	Trennleistungsparameter	---
n	Anzahl der Stichproben	---
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an Hydroniumionen	---
pK_A	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten einer Säure	---
Δp	Druckunterschied	$[\text{N} \cdot \text{m}^{-2}]$
R	Innenradius der Kapillare	$[\text{m}]$
$R_{i,j}$	Auflösung der Analyten (i) und (j)	---
r_i	Radius von Teilchen (i)	$[\text{m}]$
$\hat{\sigma}$	Standardabweichung	---
$\hat{\sigma}_m$	totale Standardabweichung	---
$\hat{\sigma}_R$	Vergleichs-Standardabweichung	---
$\hat{\sigma}_r$	Wiederhol-Standardabweichung	---
$\hat{\sigma}^2$	Varianz	---
T	absolute Temperatur	$[\text{K}]$
T_F	berechneter F-Wert	---
T_t	berechneter t-Wert	---
t	T-Faktor	---
t_{inj}	Injektionszeit	$[\text{s}]$
$t_{mig,i}$	Migrationszeit des Teilchens (i)	$[\text{s}]$
U	Spannung	$[\text{V}]$
V_{inj}	injiziertes Probenvolumen	$[\text{m}^3]$
v_{eo}	Geschwindigkeit des EOF	$[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$
$v_{ep,i}$	Wanderungsgeschwindigkeit von (i)	$[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$
$v_{ges,i}$	Gesamtgeschwindigkeit von (i)	$[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$
$w_{0.5,i}$	Peakbreite von (i) auf halber Peakhöhe	$[\text{m}]$
x_i	einzelner Wert aus einer Stichprobe	---
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert	---

ψ_0	Nernst- oder Wandpotential	[V]
z_i	Anzahl der Ladungen pro Teilchen (i)	---
ζ	Zetapotential	[V]

Abkürzung

Bedeutung

ACN	Acetonitril
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
API	atmospheric pressure ionisation
BGE	Hintergrundelektrolyt
CE	Kapillarelektrophorese(-gerät)
CRM	charge residue model
CV	coefficient of variation
DAD	Dioden-Array-Detektor
EI	electron impact ionisation
EOF	elektroosmotischer Fluss
EIE	extrahiertes-Ionen-Elektropherogramm
ESI	electrospray ionisation
HPLC	high-performance-liquid-chromatography
IEM	ion evaporation mechanism
IP	isoelektrischer Punkt
IPA	Isopropanol
IS	Interner Standard
K1	durch IS kompensierbare, zeitliche Varianzkomponenten vom Typ 1
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
LOD	Detektionsgrenze (limit of detection)
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektromet(-rie/-er)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NACE	non aqueous capillary electrophoresis
NI1	Varianzkomponenten bei isotopenmarkiertem IS

NK1	durch IS nicht kompensierbare Varianzkomponenten vom Typ1
PCM	Paracetamol
RSD%	relative Standardabweichung
RSD% _R	relative Vergleichs-Standardabweichung
RSD% _r	relative Wiederhol-Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	selected ion monitoring
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
TFA	Trifluoressigsäure
TIE	Totalionenstromelektropherogramm
UV/Vis	Spektrometrie im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich des Lichtes

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Bedeutung der Kapillarelektrophorese ist seit den ersten erfolgreichen Trennungen von Aminosäuren, Dipeptiden und Aminen in Kieselglaskapillaren mit einem geringeren Innendurchmesser als 100 µm durch JORGENSEN und LUKACS (1981) [1] stetig gewachsen. Heute sind kapillarelektrophoretische Trennungen, in der Regel mit UV-Detektion, in den meisten analytischen Laboren üblich.

Nur 13 Jahre vor JORGENSEN legten DOLE et al. [2] die Grundlagen zur Entwicklung der Elektrosprayionisation. Nun war es erstmals möglich, Moleküle vollständig, also ohne Fragmentierungsreaktionen, als Ion in die Gasphase zu bringen, um anschließend ihr Masse-Ladungs-Verhältnis mit massenspektrometrischer Detektion zu bestimmen. Da bei diesem Ionisierungsverfahren die Ionen direkt aus einer Lösung in die Gasphase überführt werden, wurden schnell Möglichkeiten zur online-Kopplung mit chromatographischen [3] und kapillarelektrophoretischen Trennverfahren [4, 5] vorgestellt. Die Kombination von hocheffizienter Probenaufftrennung mit LC oder CE und anschließender Identifikation der Peaks über ihr Masse-Ladungs-Verhältnis, sowie der Möglichkeit zu gleichzeitiger Quantifizierung über die Signalintensität haben solche Systeme zu wichtigen Instrumenten in der Analytik werden lassen.

Besonders im Bereich der pharmazeutischen Analytik spielt neben der qualitativen die quantitative Bestimmung von Substanzen eine wichtige Rolle, beispielsweise bei der Charakterisierung von Nebenprodukten. Um eine gleich bleibend hohe Arzneimittelqualität und –sicherheit zu gewährleisten, werden von den Kontrollbehörden wie der Deutschen Arzneimittel- und Medizinprodukteagentur (DAMA) (früher: Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)), der European Medicines Agency (EMA) oder der Food and Drug Administration (FDA) valide Methoden in der Arzneimittelanalytik nach den qualitätssichernden Richtlinien Q2A und Q2B der International Conference on Harmonization (ICH) gefordert. Daher sollte bereits bei der Methodenentwicklung im Hinblick auf eine spätere Validierung auf eine möglichst hohe Präzision geachtet werden.

Während LC-MS bereits häufig für qualitative und quantitative Bestimmungen eingesetzt wird, ist die zur Substanzidentifikation regelmäßig eingesetzte CE-MS

aufgrund der unzureichenden Präzision der Signalintensität in der Routinequantifizierung noch nicht etabliert [6]. Die Ursache liegt im unterschiedlichen Aufbau der Ionenquellen für LC- und CE-Kopplungen. Das eluierte Volumen pro Minute ist bei der CE sehr viel geringer und wird daher bei den meisten Konstruktionen mit Hilfe eines zusätzlichen Lösemittelzuflusses (sheath-flow) erhöht. Es wird angenommen, dass dieser zusätzliche Fluss die Hauptursache für die niedrigere Präzision ist [7].

Die Probenauftrennung mit Hilfe der CE bietet gegenüber der LC einige Vorteile. Neben der durch den Trennmechanismus bedingten unterschiedlichen Selektivität, sind beispielhaft eine höhere Trennleistung, geringerer Proben- und Lösemittelverbrauch, hohe Trenngeschwindigkeit und die einfache Möglichkeit zu chiralen Trennungen zu nennen. Mit diesem Hintergrund ist es wünschenswert, für CE-MS-Methoden eine der LC-MS vergleichbare Präzision zu erreichen. Dazu müssen die Ursachen für die niedrigere Präzision erkannt und, wenn möglich, kontrolliert werden.

In mehreren Publikationen wird der Einfluss des sheath-flow und anderer Parameter auf Ionisierungseffizienz und Stabilität des Ionisierungsprozesses untersucht und dokumentiert [8-12]. Die Präzisionen der in diesen Veröffentlichungen vorgestellten Methoden liegen unterhalb derer von Bestimmungen mit LC-MS. Daher müssen bei der Kopplung von Kapillarelektrophorese mit Massenspektrometrie weitere Ursachen für Variationen existieren, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht und diskutiert werden sollen.

Da in keiner der publizierten Untersuchungen die möglichen Auswirkungen des Hintergrundelektrolyten der elektrophoretischen Trennung auf die Präzision näher beschrieben werden, soll die Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten variiert und so sein Anteil an der Gesamtvarianz der Signalintensität bestimmt werden. Weiterhin soll mit der Bearbeitung unterschiedlicher Proben das Ausmaß der Präzisionserhöhung durch den Einsatz verschiedener Interner Standards abgeschätzt werden. Das Erkennen und Charakterisieren von weiteren Faktoren, welche die resultierende Peakfläche beeinflussen, ist ein weiteres Ziel der Untersuchungen. Die Experimente sind als langfristige Messreihen ausgelegt ($n \approx 100$), da verlässliche Aussagen über Streumaße nur bei hohen Datenzahlen möglich

sind. Zur Kopplung wurde der wegen seiner Robustheit am weitesten verbreitete Interfacetyp (sheath-flow) eingesetzt, um die erzielten Ergebnisse mit möglichst vielen, bereits veröffentlichten Daten vergleichen zu können.

Obwohl es bei der Methodenentwicklung für quantitative CE-MS einige Besonderheiten gibt, die einen Transfer von CE-UV-Methoden schwierig gestalten, existiert bislang noch kein publiziertes Schema, das speziell auf die Problematiken quantitativer CE-MS abgestimmt ist. Daher soll aus den eigenen Ergebnissen und mit Hilfe der Auswertung von Literaturdaten eine allgemeine Anleitung zur Methodenentwicklung für quantitative CE-MS-Bestimmungen entwickelt und zusätzlich die bei den eigenen Versuchen erreichte Präzision mit den Literaturwerten verglichen werden.

2 Kapillarelektrophorese

Unter Kapillarelektrophorese versteht man die elektrophoretische bzw. elektroosmotische Wanderung von geladenen und ungeladenen Teilchen nach Anlegen einer Hochspannung in einer mit einem Elektrolyten gefüllten Kapillare.

2.1 Instrumenteller Aufbau

Die Abbildung 2.1-1 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes mit UV-Detektion. Das Kernstück des Gerätes ist die Kapillare, in der die Trennung erfolgt. Bei den meisten kommerziell erhältlichen Systemen ist sie in eine Kartusche aus Kunststoff eingesetzt, um einen Kapillartausch zu erleichtern. Diese Kartusche ist oft thermostatisiert, so dass die bei der Trennung auftretende Joulewärme kompensiert werden kann.

Während der elektrophoretischen Trennung tauchen die Kapillarenden jeweils gemeinsam mit einer Platinelektrode in ein Gefäß, das mit dem Hintergrundelektrolyten (BGE) gefüllt ist. Da die Platinelektroden über eine Hochspannungsquelle miteinander verbunden sind und die Kapillare mit einer leitenden Flüssigkeit (BGE und Probe) gefüllt ist, kann man hier von einer elektrolytischen Zelle sprechen. In den meisten Fällen wird ein Puffer als BGE verwendet, denn durch Elektrolyse des Lösemittels entstehen unter anderem Hydroniumionen, die den pH-Wert in der Kapillare ändern und damit die Trennbedingungen beeinflussen würden. Die Elektrolytgefäße können über einen Probenwechsler z.B. gegen ein Probengefäß getauscht werden.

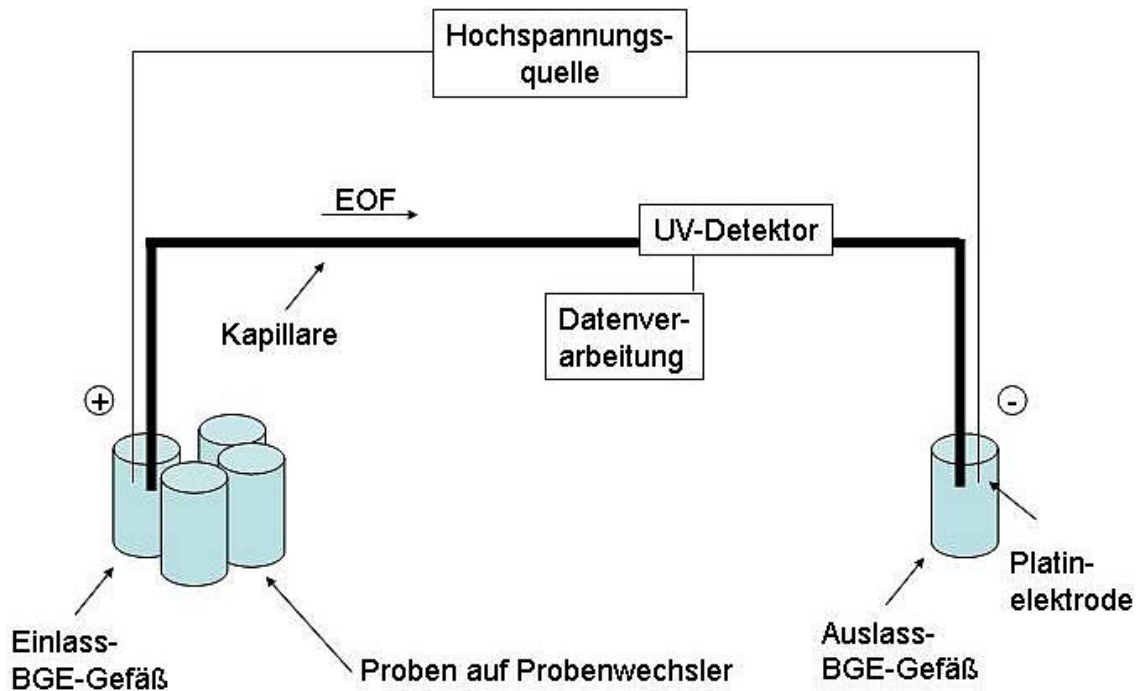


Abb. 2.1-1: Schematisierter Aufbau einer Messapparatur für die Kapillarelektrophorese bei positiver Polung mit der Möglichkeit zur UV- oder Fluoreszenz-Detektion. Bei der Kopplung mit Massenspektrometrie entfällt das zweite Elektrolytgefäß und die Kapillare endet im Massenspektrometer (MS). In der Darstellung wurde das Drucksystem zur Injektion nicht abgebildet.

In den meisten Fällen wird eine positive Gleichspannung angelegt. Man spricht dann von positiver Polung, bei der der positive Pol (Anode) auf der Probenauftragseite liegt, während die Elektrode an der Auslassseite folglich die Kathode ist. Der Probenauftrag erfolgt entweder mit Hilfe eines Drucksystems, das einen Über- oder Unterdruck erzeugt, durch den die Probe in die Kapillare gezogen wird (hydrodynamische Injektion) oder durch das Anlegen von Spannung, so dass die als Ionen in Lösung vorliegende Probe aufgrund von Ladungskräften in die Kapillare gelangt (elektrokinetische Injektion).

2.1.1 Detektion

Kommerziell erhältliche CE-Geräte waren früher in der Regel mit einfachen UV/Vis-Detektoren ausgestattet. Heute werden hauptsächlich Dioden-Array-Detektoren (DAD) angeboten, die eine Vermessung der Absorption im gesamten UV-Spektrum gleichzeitig ermöglichen. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, werden zusätzlich laserinduzierte Fluoreszenzdetektoren (LIF), spezielle Bubble-Cell-Detektorfenster

für UV-Detektion und elektrochemische Detektoren verwendet [13]. Die Kopplung an ein Massenspektrometer bietet, außer meist erhöhter Empfindlichkeit, mit der Bestimmung des Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Analyten den Vorteil einer zweiten Trennebene.

2.1.2 Kapillaren

Die in der CE verwendeten Kapillaren bestehen aus Kieselglas (engl. fused silica, oft nicht ganz korrekt mit „Quarzglas“ übersetzt). Kieselglas bietet den Vorteil, dass es für alle relevanten UV-Wellenlängen durchlässig ist und eine vergleichsweise hohe Wärmeleitfähigkeit aufweist. In der Regel verwendet man Kapillaren mit Innendurchmessern von 25 - 100 μm . Da es sich bei Kieselglas um ein sehr sprödes Material handelt, sind die Kapillaren zur Stabilisierung mit einer ca. 15 μm starken Polyimidschicht überzogen, in die bei UV-Detektion ein ca. 3 mm breites Detektionsfenster gebrannt werden muss.

Vor der ersten Verwendung einer Kapillare muss diese konditioniert und äquilibriert werden. Dazu wird eine stark alkalische Lösung (meistens Natriumhydroxid-Lösung) bei erhöhter Temperatur durch die Kapillare gepumpt. Dadurch werden Silanolgruppen an der Oberfläche vollständig deprotoniert und eventuell vorhandene Siloxangruppen hydrolysiert (Konditionierung). Anschließend wird die Kapillare mit BGE gefüllt und eine Spannung angelegt (Äquilibrierung), um sie an den für die Trennung verwendeten pH-Wert anzupassen. Das Ziel dieser Maßnahmen ist eine möglichst gleichmäßige Ladungsverteilung über die gesamte Kapillarlänge und somit ein konstanter elektroosmotischer Fluss (EOF) (siehe Kapitel 2.2.2).

2.2 Theoretische Grundlagen

2.2.1 Elektrophoretische Mobilität

Die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld wird als Elektrophorese bezeichnet. Dabei migrieren Anionen zur Anode und Kationen zur Kathode.

Im elektrischen Feld wirken auf die Teilchen zwei entgegengesetzt gerichtete Kräfte ein, die elektrische Kraft F_{el} und die Reibungskraft F_{re} . Mit Gleichung (1) wird die

elektrische Kraft F_{el} beschrieben. Zur Vereinfachung geht man bei (1) davon aus, dass bei der Elektrophorese mit einer unendlich verdünnten Lösung gearbeitet wird und daher keine ionischen Wechselwirkungen stattfinden.

$$F_{el} = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad [\text{N}] \quad (1)$$

z_i = Anzahl der Ladungen pro Teilchen (i); e_0 = Elementarladung ($1.602 \cdot 10^{-19}$ A·s);
 E = elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

Der elektrischen Kraft F_{el} entgegengesetzt wirkt die Reibungskraft F_{re} . Die Reibung in flüssigen Medien lässt sich mit Hilfe des Stoke'schen Gesetzes (2) berechnen. Bei der Betrachtung der Gleichung zeigt sich, dass die resultierende Reibungskraft zur Viskosität des Mediums η , dem Teilchenradius r_i und der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens im elektrischen Feld $v_{ep,i}$ proportional ist.

$$F_{re} = 6 \pi \cdot r_i \cdot \eta \cdot v_{ep,i} \quad [\text{N}] \quad (2)$$

η = Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]; r_i = Radius von Teilchen (i) [m]; $v_{ep,i}$ = Wanderungsgeschwindigkeit von (i) [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

Ist F_{el} größer als F_{re} , bewegen sich die Ionen in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die Geschwindigkeit mit der sie sich bewegen, lässt sich berechnen, indem man (1) und (2) gleichsetzt und nach $v_{ep,i}$ umformt (3).

$$v_{ep,i} = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (3)$$

Es ist zu erkennen, dass die resultierende Geschwindigkeit $v_{ep,i}$ direkt proportional zur angelegten elektrischen Feldstärke E ist. Den Proportionalitätsfaktor zwischen diesen beiden Größen bezeichnet man als elektrophoretische Mobilität $\mu_{ep,i}$.

$$\mu_{ep,i} = \frac{v_{ep,i}}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (4)$$

Aus den Gleichungen (3) und (4) lässt sich ableiten, dass das Vorzeichen von $v_{ep,i}$ und $\mu_{ep,i}$ vom Vorzeichen der Ladungszahl z_i bestimmt wird. Anhand des Vorzeichens von $v_{ep,i}$ oder $\mu_{ep,i}$ kann man also die Migrationsrichtung einzelner Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Ladung (positiv oder negativ) ablesen [14].

Die elektrophoretische Mobilität ist demnach sowohl von äußeren, auf alle Teilchen gleich einwirkenden, Faktoren wie der Viskosität des Mediums η und der elektrischen Feldstärke E , als auch von den teilchenspezifischen Faktoren z_i und r_i abhängig.

Hier zeigen sich die maßgeblichen Trennprinzipien der Elektrophorese: Verschiedene Substanzen wandern erstens je nach ihrer Ladung in unterschiedliche Richtungen (Vorzeichen von z_i) und zweitens in Abhängigkeit ihrer Ladungsdichte z_i unterschiedlich schnell. Ein dritter, die Trennung beeinflussender Faktor, ist die Größe des Ions: Je größer ein Ion ist, desto langsamer wandert es ($1/r_i$). Die Viskosität der Lösung hat ebenfalls einen Einfluss, der aber im Vergleich zur Gelelektrophorese geringer ist, da bei der CE meist in wässrigen Medien gearbeitet wird.

2.2.2 Elektroosmotischer Fluss (EOF)

In einer Kieselglaskapillare kommt ein weiterer Faktor hinzu, der die Trennung von Substanzen beeinflusst: der elektroosmotische Fluss (EOF), der durch die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Grenzfläche zwischen der Kapillaroberfläche und der sich in der Kapillare befindenden Flüssigkeit entsteht.

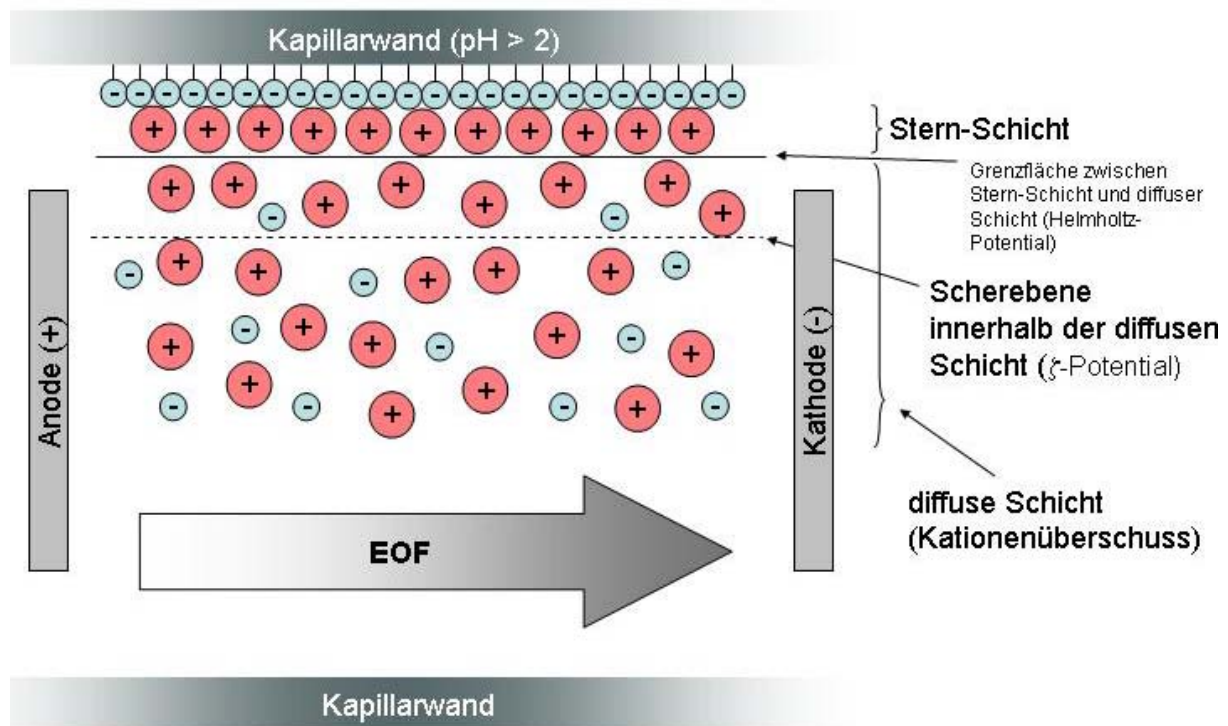


Abb. 2.2.2-1: Entstehung des elektroosmotischen Flusses (EOF) basierend auf [15]. Die Darstellung ist nicht maßstabsgerecht: Während der Kapillardurchmesser bei etwa 50 μm liegt, ist die Dicke der diffusen Schicht etwa 10 nm. Die innere Helmholtz-Schicht ist nicht dargestellt, da sie für die Entstehung des EOF keine Bedeutung hat. Zwischen der diffusen Schicht und dem Hintergrundelektrolyten mit ausgeglichener Ladungsbilanz gibt es einen fließenden Übergang.

Die schwach sauren Silanolgruppen (pK_A : 3.5 – 8.2 [16]) an der Kapillaroberfläche werden bei Kontakt mit einem protischen Medium ab pH 2 deprotoniert, so dass die Oberfläche negativ geladen ist. Die negativen Ladungen werden durch Kationen aus dem BGE ausgeglichen, wobei sich eine Doppelschicht ausbildet: Eine direkt an der Wand festsitzende Schicht (Stern-Schicht) und eine diffuse Schicht (Gouy-Chapman-Schicht), in der ein Überschuss an Kationen vorliegt [15]. Die Stern-Schicht setzt sich aus der inneren und äußeren Helmholtz-Schicht zusammen, wobei nach SCHWER et al. [17] die erstere aus kontaktadsorbierten, desolvatisierten Anionen besteht, während die Kationen in der äußeren Helmholtz-Schicht aufgrund ihrer Solvatisierung nicht in der Lage sind, die fixierten und damit kleineren (nicht solvatisierten) Silanolatgruppen vollständig zu neutralisieren [16]. Das geschieht mit Kationen der diffusen Schicht, die aufgrund der Abschirmung durch die Kationen der Helmholtz-Schicht nicht so fest an die Silanolatgruppen gebunden, und somit durch Diffusionsprozesse beweglich sind.

In der Stern-Schicht nimmt das Potential linear zur Kapillarmitte ab, während in der diffusen Schicht ein exponentieller Abfall vorliegt. Durch den Prozess des Ladungsausgleichs entsteht ein zur Kapillarmitte abnehmendes Konzentrationsgefälle an Kationen. Das Potential an der Scherebene innerhalb der diffusen Schicht bezeichnet man als ζ -Potential [15]. Über die genaue Lokalisation des ζ -Potentials gibt es unterschiedliche Angaben: Nach SCHWER und KENNDLER fällt die Scherebene mit der äußeren Helmholtz-Schicht zusammen [17]. Laut RUPPRECHT [15] ist an dieser Stelle das Helmholtz-Potential messbar.

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes beginnt sich die diffuse Schicht an der Scherebene durch den dort vorherrschenden Überschuss an positiver Ladung in Richtung der Kathode zu bewegen. Die Bewegung der Kationen der diffusen Schicht wird über deren Hydrathülle auf die gesamte Flüssigkeitssäule in der Kapillare übertragen, die sich dadurch mit einem stempelförmigen Profil und gleichmäßiger Geschwindigkeit v_{eo} in Richtung Kathode bewegt.

Da das ζ -Potential vom Wandpotential ψ_0 und damit vom pH-Wert des BGE abhängig ist, spielt der pH-Wert für die Stärke des EOF eine entscheidende Rolle. Bei hohen pH-Werten, also vollständiger Dissoziation der Silanolgruppen, erreicht das ζ -Potential einen Maximalwert von etwa -120 mV [14]. Weiterhin ist das ζ -Potential von der Ionenstärke des BGE abhängig, da sich die Dicke der diffusen Schicht mit dieser Größe ändert.

Die Geschwindigkeit des EOF lässt sich mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung berechnen (5).

$$v_{eo} = -\frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (5)$$

ε = Dielektrizitätskonstante [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]; η = Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]

Diese Gleichung zeigt, dass die resultierende Geschwindigkeit des EOF sowohl zur Stärke des angelegten elektrischen Feldes E , als auch (über ζ) zum pH-Wert und der Ionenstärke des verwendeten BGE proportional ist. Außerdem wird deutlich, dass der Kapillardurchmesser auf v_{eo} keinen Einfluss hat [14]. Außerhalb der diffusen Schicht hat v_{eo} über die gesamte Flüssigkeitssäule hinweg einen konstanten Wert.

Der EOF ist der vierte Faktor, der die Auftrennung verschiedener Analyten beeinflusst, da er ab einem pH von etwa 2 in unbehandelten Quarzkapillaren immer kathodengerichtet auftritt. Von eher theoretischer Natur ist das Vorkommen eines sehr geringen anodengerichteten EOF bei einem pH-Wert von 0, bei dem die Silanolgruppen teilweise protoniert vorliegen.

Die Bewegung einer Substanz in der Kapillare wird also von $v_{ep,i}$, der Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens im elektrischen Feld (substanztypisch) und von v_{eo} , der Geschwindigkeit des EOF (substanzunspezifisch) bestimmt. Man kann die beiden Geschwindigkeiten als sich überlagernde Vektoren betrachten, wobei aus der Summe beider Geschwindigkeiten eine Gesamtgeschwindigkeit $v_{ges,i}$ entsteht (6).

$$v_{ges,i} = v_{ep,i} + v_{eo} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (6)$$

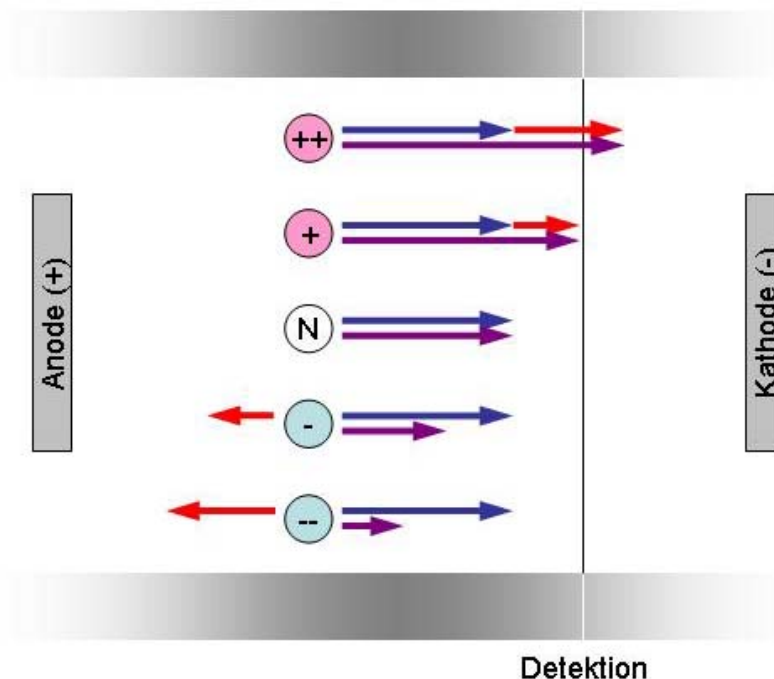


Abb. 2.2.2-2: Überlagerung von elektroosmotischer (blau) und elektrophoretischer (rot) Mobilität zur Gesamtmobilität (violett). Bei ausreichend hohem elektroosmotischen Fluss (EOF) bewegen sich die meisten Moleküle, auch Anionen, in Richtung Kathode.

In der Praxis arbeitet man nicht, wie anfangs angenommen in unendlich verdünnten Lösungen. Daher ist die Mobilität des Teilchens (i) auch von der Konzentration und somit der Ionenstärke des BGE abhängig. Man spricht von der tatsächlichen Mobilität

des Teilchens (i) $\mu_{act,i}$. Diese ergibt sich nach Gleichung (7) aus f_i , einem Korrekturfaktor, der unter anderem die veränderte Ionenstärke höher konzentrierter Lösungen ausgleicht und $\mu_{ep,i}$, der Mobilität.

$$\mu_{act,i} = f_i \cdot \mu_{ep,i} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (7)$$

In den meisten Fällen handelt es sich bei den Analyten um schwache Elektrolyte. Da diese in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedlich dissoziiert und damit unterschiedlich ionisiert vorliegen, muss auch der Dissoziationsgrad α_D in die Berechnung der elektrophoretischen Mobilität des Analyten einbezogen werden; es ergibt sich die effektive Mobilität von (i) $\mu_{eff,i}$ (8) [14].

$$\mu_{eff,i} = \mu_{act,i} \cdot \alpha_D \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (8)$$

Der Wert für α_D wird für schwache Säuren nach (9) und für schwache Basen nach (10) berechnet:

$$\alpha_D = \frac{1}{(1 + 10^{pK_a - pH})} \quad (9)$$

$$\alpha_D = \frac{1}{(1 + 10^{pH - pK_a})} \quad (10)$$

Nimmt man die Änderungen aus (7) und (8) in (6) auf und beachtet (4), ergibt sich für die Gesamtgeschwindigkeit $v_{ges,i}$ folgende Gleichung (11):

$$v_{ges,i} = (\mu_{eff,i} + \mu_{eo}) \cdot E \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (11)$$

Alternativ kann $v_{ges,i}$ direkt aus einem Elektropherogramm abgeleitet werden, denn die Gesamtgeschwindigkeit von (i) ergibt sich aus der in der Migrationszeit $t_{mig,i}$ zurück gelegten Strecke l . Bei l handelt es sich um die effektive Länge der Kapillare, also der Strecke von der Kapillaröffnung an der Injektionsseite bis zum Detektorfenster.

$$v_{ges,i} = \frac{l}{t_{mig,i}} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (12)$$

Anschließend kann die Gesamtmobilität $\mu_{ges,i}$ eines Ions aus dessen Migrationsgeschwindigkeit berechnet werden: Die elektrische Feldstärke E ist der Quotient aus der angelegten Spannung U und der Gesamtlänge L der Kapillare.

$$E = \frac{U}{L} \quad [\text{V} \cdot \text{m}^{-1}] \quad (13)$$

Nach dem Einsetzen von (12) und (13) in (4) ergibt sich die Formel zur Berechnung der Gesamtmobilität von (i), die sich analog zur Gesamtgeschwindigkeit $v_{ges,i}$ (6) ebenfalls aus der Summe der effektiven Mobilität und der Mobilität des EOF berechnen lässt.

$$\mu_{ges,i} = \frac{l \cdot L}{t_{mig,i} \cdot U} = \mu_{eff,i} + \mu_{eo} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (14)$$

2.2.3 Trennprinzip in der Kapillarelektrophorese

Wie bereits beschrieben und in Abbildung 2.2.2-2 gezeigt, basiert die Trennung von Substanzen in der Kapillarelektrophorese auf der Summe (6) des Größen- (bzw. Masse-) Ladungs-Verhältnisses der Analyten (4) und der Stärke und Richtung des EOF. Sowohl die Mobilität des Analyten, als auch die Ausprägung des EOF sind vom pH-Wert und der Ionenstärke des Hintergrundelektrolyten abhängig.

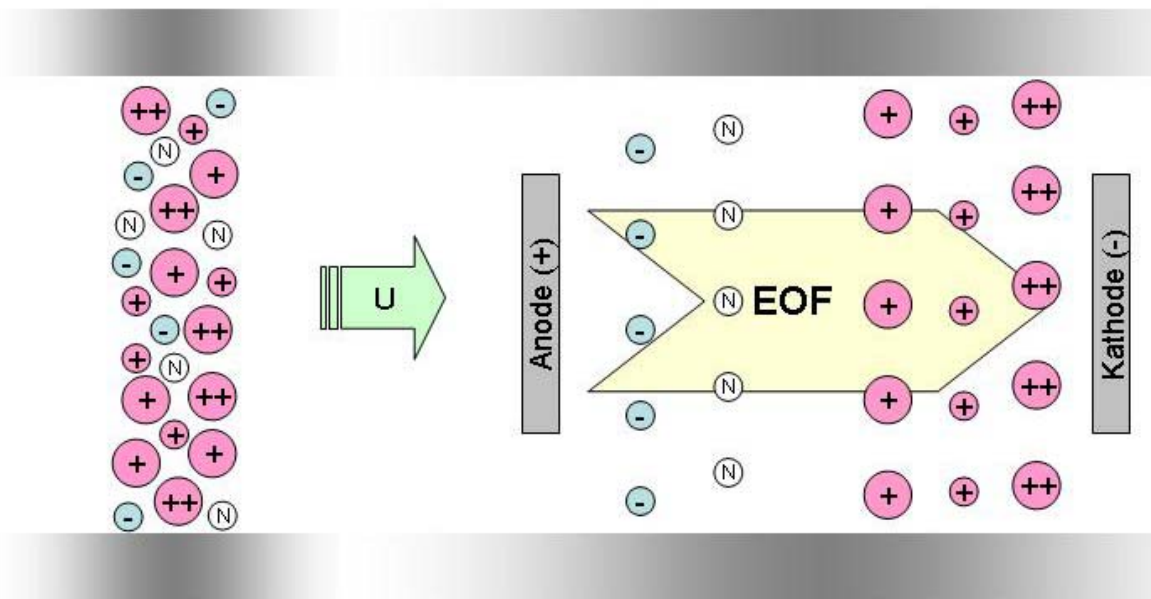


Abb. 2.2.3-1: Auftrennung von Substanzen nach Anlegen einer Spannung U bei positiver Polung.

In Abb. 2.2.3-1 erkennt man, dass die zweifach geladenen Kationen am stärksten zur Kathode gezogen werden. Zusätzlich werden sie wie alle anderen Analyten vom EOF in Richtung Kathode bewegt, so dass sie als erstes die Kathode erreichen. Die Kationen mit kleinem Radius migrieren aufgrund ihres kleineren Masse-Ladungs-Verhältnisses schneller (geringere Reibung) als die größeren Kationen mit gleicher Ladungszahl z . Neutrale Substanzen werden ausschließlich vom EOF bewegt, während die Anionen entgegen ihrer elektrophoretischen Bewegung vom EOF mitgerissen werden, so dass bei ihnen die langsamste Migrationsgeschwindigkeit resultiert.

2.3 Leistungskriterien von kapillarelektrophoretischen Trennungen

2.3.1 Trennleistung

Die Trennleistung des Systems wird von der Anzahl der Substanzen definiert, die in einem bestimmten Zeitintervall getrennt werden können. Das heißt, je schmaler ein Peak ist, desto größer ist die Trennleistung des angewendeten Verfahrens [18].

Die Trennleistung wird durch das Strömungsprofil innerhalb der Kapillare beeinflusst. Das ist ein Grund für die gegenüber der HPLC überlegene Trennleistung der CE. In der HPLC wird die Probenflüssigkeit mittels Druck durch die Säule gepumpt. Die Bewegung der Flüssigkeitssäule in der Trennsäule wird also von außen forciert. Durch die höhere Reibung an der Säulenwand im Vergleich zur Säulenmitte wird die Flüssigkeit an der Wand stärker abgebremst, so dass ein parabolisches Strömungsprofil resultiert. Bei der CE hingegen geht die treibende Kraft von der Kapillarwand aus. Die Reibung an der Kapillarwand wird von dem die Flüssigkeitssäule vorantreibenden EOF direkt kompensiert, so dass hier ein stempelförmiges Strömungsprofil vorliegt [19].

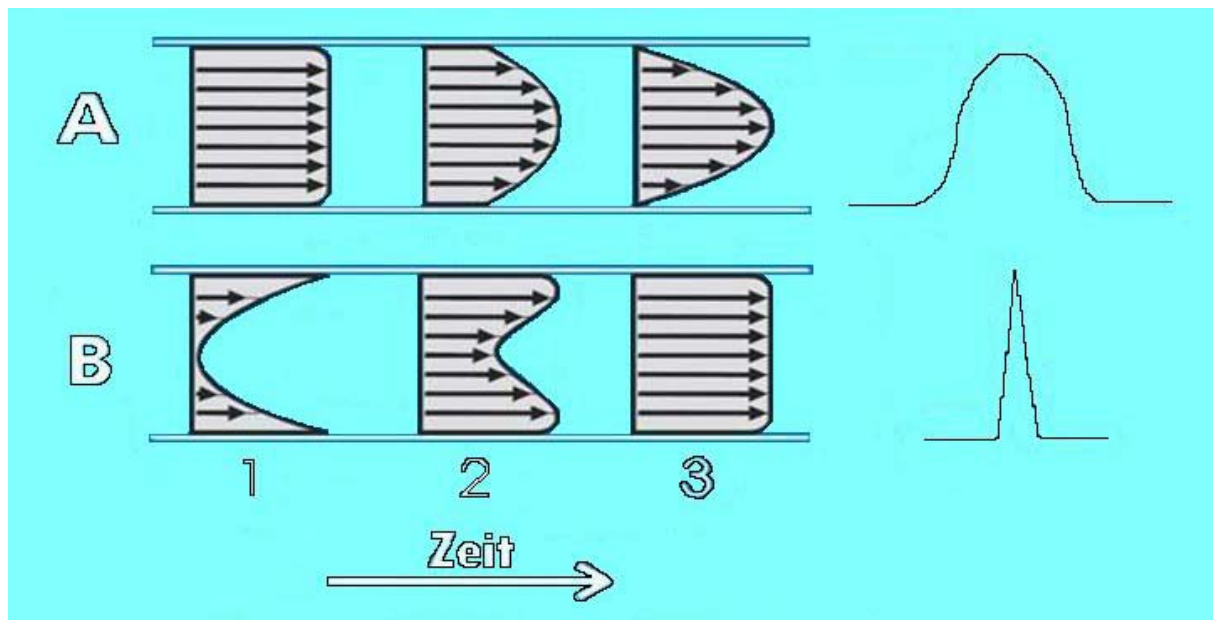


Abb. 2.3.1-1: Vergleich der Strömungsprofile bei der HPLC (A) und der CE (B) und den daraus resultierenden Peakformen (rechts).

Durch das parabolische Strömungsprofil bei der HPLC kommt es im Vergleich zur CE zu einer ungleichmäßigeren Beschleunigung und somit zu einer stärkeren Verteilung des Analyten in der Trennsäule, die zu einer geringeren Trennleistung führt [20]. Bei der CE entfallen zwei von drei der in der van Deemter-Gleichung beschriebenen Hauptursachen für Peakverbreiterungen in der HPLC [18]. Da es keine stationäre Phase gibt, bleibt die Eddy-Diffusion aus, die durch unterschiedlich lange Wanderstrecken der Probenmoleküle durch das Trennbett entsteht. Außerdem finden keine Übergänge der Probenmoleküle von der festen in die flüssige Phase und umgekehrt statt.

Die einzige auch bei der CE zum Tragen kommende Ursache für Peakverbreiterungen ist die Longitudinaldiffusion D_i [19], die durch Konzentrationsunterschiede zwischen Probenzone und BGE hervorgerufen wird und laut der Stokes-Einstein Gleichung (15) abhängig von der Temperatur T , vom Radius r_i und der Viskosität des Mediums η ist.

$$D_i = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}] \quad (15)$$

k = Boltzmann Konstante ($1.380658 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)

Werden die Gleichungen (4) und (15) jeweils nach $6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta$ aufgelöst, gleichgesetzt und im Anschluss nach D_i aufgelöst, so erhält man (16):

$$D_i = \frac{\mu_{ep,i} \cdot k \cdot T}{z_i \cdot e_0} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}] \quad (16)$$

Um Trennleistungen vergleichen zu können, wird in der HPLC die Trennstufenzahl N verwendet. Da aber in der CE die Trennung nicht auf Gleichgewichtseinstellungen auf virtuellen Trennböden basiert, spricht man hier korrekterweise von dem Trennleistungsparameter N (17).

$$N = \frac{\mu_{ep,i} \cdot l \cdot U}{2 \cdot D_i \cdot L} \quad (17)$$

Vereinfacht man Gleichung (17) mit der Annahme, dass l und L annähernd gleich sind und ersetzt D_i durch Gleichung (16) [21], so erhält man:

$$N = \frac{z_i \cdot e \cdot U}{2 \cdot k \cdot T} \quad (18)$$

Anhand Gleichung (18) wird erkennbar, dass die Trennleistung in der CE, sofern die Temperatur konstant bleibt, nur von der angelegten Spannung und der Ladungszahl abhängig ist [1]. Im Unterschied zur HPLC ist die Länge der Kapillare für die Trennleistung des Systems nicht entscheidend [14]. Dieser Vorteil schlägt sich auch in der zunehmenden Verwendung von Chip-CE Systemen mit sehr kurzen Trennstrecken und folglich kurzen Analysenzeiten nieder.

N kann auch direkt aus einem Elektropherogramm anhand der Migrationszeit $t_{mig,i}$ und der Peakbreite auf halber Höhe des Peaks $w_{0.5,i}$ berechnet werden (19).

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_{mig,i}}{w_{0.5,i}} \right)^2 \quad (19)$$

Bei der Bestimmung von N nach (19) ist darauf zu achten, dass $t_{mig,i}$ und $w_{0.5,i}$ in derselben Einheit angegeben werden, da N eine dimensionslose Kenngröße ist. Sind in einem Elektropherogramm mehrere Peaks vorhanden, so ist N aus jedem Peak berechenbar, da es sich, wie aus (18) erkennbar, nicht um eine substanzspezifische Größe handelt [18].

Weitere, die Trennleistung in der CE reduzierende Faktoren sind: Wärmeentwicklung durch den elektrischen Widerstand der gefüllten Kapillare („Joulesche Erwärmung“; engl. joule heating), Unterschiede in der Leitfähigkeit von Probenzone und Hintergrundelektrolyt, sowie Überladungseffekte und die Länge der injizierten Probenzone. Außerdem können Adsorption der Analyten an der Kapillarwand oder auch unterschiedlich zurückgelegte Wanderstrecken in aufgewickelten Kapillaren [14] die Trennleistung beeinflussen (Kap. 6.1).

2.3.2 Selektivität / Trennfaktor

Der Trenn- oder Selektivitätsfaktor $\alpha_{i,j}$ wird in der CE als Maß für die Auftrennung zweier Stoffe bezeichnet und ist ein Indikator für Mobilitätsunterschiede verschiedener Analyten.

$$\alpha_{ij} = \frac{\mu_{eff,i}}{\mu_{eff,j}}, \mu_{eff,i} > \mu_{eff,j} \quad (20)$$

Für eine vollständige Trennung ist ein Trennfaktor von $\alpha_{i,j} \geq 1.02$ ausreichend. Sind im Rahmen einer Quantifizierung die eingesetzten Konzentrationen höher und die Peaks daher breiter, so sollte bei der Methodenentwicklung auf einen Wert $\alpha_{i,j} \geq 1.1$ abgezielt werden [22].

2.3.3 Auflösung

Unter der Auflösung R_{ij} (engl. resolution) versteht man die Güte der Auftrennung zweier aufeinander folgend migrierender Analyten (i) und (j). Wie aus der von FRIEDL et al. [23] beschriebenen Gleichung (21) erkennbar ist, gehen in R_{ij} sowohl die Trennleistung (vgl.(18)), als auch die Selektivität (vgl.(20)) ein [18].

$$R_{ij} = \sqrt{\frac{e \cdot U}{8 \cdot k \cdot T}} \cdot \frac{(\mu_{eff,i} - \mu_{eff,j}) \cdot \sqrt{z_i \cdot z_j}}{\mu_{eff,i} \cdot \sqrt{z_i} + \mu_{eff,j} \cdot \sqrt{z_j}} \quad (21)$$

In der Praxis wird die Auflösung analog zur Chromatographie aus den Elektropherogrammen berechnet (22).

$$R_{ij} = 1.18 \cdot \frac{(t_{mig,j} - t_{mig,i})}{w_{0.5,i} + w_{0.5,j}} \quad (22)$$

Bei der Verwendung dieser Gleichung wird vorausgesetzt, dass $t_{mig,i} < t_{mig,j}$ ist. Bei gleich intensiven, symmetrischen (gaußglockenförmigen) Peaks spricht man ab einer Auflösung von 1.5 von Basislinientrennung [21] oder 4σ -Trennung (beim Gauß-Peak: Basislinienbreite $w = 4 \cdot \sigma$). Liefert das analytische Trennproblem stark unterschiedlich große oder unsymmetrische Peaks, so ist für eine vollständige Trennung eine höhere Auflösung notwendig.

Möglichkeiten die Trennleistung, Auflösung und Selektivität zu verbessern, werden gesondert in Kapitel 6 angesprochen.

2.4 Probenaufgabe

In der Kapillarelektrophorese gibt es, wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt, zwei verschiedene Möglichkeiten des Probenauftrags: die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion.

Die hydrodynamische Injektion basiert auf Druckunterschieden zwischen den beiden Kapillarenden. Diese können auf verschiedene Arten erzeugt werden: hydrostatisch, mit Druck oder durch Vakuum. Die hydrostatische, Siphon- oder Schwerkraftinjektion stammt aus den Anfängen der CE und wird nur noch bei selbstgebauten Geräten

angewendet. Der Druckunterschied wird durch unterschiedliche Höhen der Kapillarenden auf der Einlass- und Auslassseite erreicht, so dass die Probe aus dem erhöhten Probengefäß in die Kapillare gezogen wird.

Bei kommerziell erhältlichen Geräten wird der Druck entweder durch Anlegen eines Überdrucks an das Probengefäß („pressure injection“) oder eines Unterdrucks am Kapillarende („vacuum injection“) erzeugt.

Das injizierte Volumen berechnet sich nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz (23):

$$V_{inj} = \frac{\Delta p \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t_{inj}}{128 \cdot \eta \cdot L} \quad [\text{m}^3] \quad (23)$$

Setzt man konstante Kapillarinnendurchmesser d und Probenviskositäten η voraus, so ist das injizierte Volumen V_{inj} von den Variablen Druckdifferenz Δp und Zeit t_{inj} abhängig. Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit bei der Injektion zu erreichen, ist also der schnelle Aufbau einer konstanten Druckdifferenz notwendig, was aus gerätebaulicher Sicht nicht einfach zu realisieren ist. Um die Auswirkungen von Schwankungen beim Druckaufbau zu minimieren, sollten längere Injektionszeiten mit weniger Druck gewählt werden [24, 25].

Bei der elektrokinetischen Injektion taucht ein Kapillarende in das Probengefäß, das andere in ein Gefäß, das mit BGE gefüllt ist. Anschließend wird über einen definierten Zeitraum Spannung angelegt. Je nach Vorzeichen und Stärke der Spannung, sowie nach der Mobilität der in der Probe vorhandenen Spezies, migrieren diese in die Kapillare. Das bedeutet auch, dass neutrale und der angelegten Gleichspannung entgegengesetzt geladene Substanzen nicht in die Kapillare gelangen; der injizierte Probenanteil ist also kein repräsentativer Aliquot aus dem Probengefäß, da einige Spezies angereichert, andere diskriminiert werden („bias-effect“). Diese Selektivität der Injektion kann ein Nachteil, aber auch ein Vorteil sein, wenn beispielsweise bereits durch die Probenaufgabe Störkomponenten abgereichert bzw. Probenmoleküle angereichert werden sollen [6, 19, 24]. Mit elektrokinetischer Injektion ist es möglich, Analyten selektiv in die Kapillare zu injizieren und dabei eine starke Aufkonzentrierung zu erreichen. Dabei ist sicherzustellen, dass die Probe nicht aufgrund der hohen Konzentration in der Kapillare ausfällt. Ein weiterer Nachteil dieser Injektion bei quantitativen

Bestimmungen kann die sinkende Konzentration der Analyten im Probengefäß sein. Daher sollte pro Probengefäß immer nur einmal elektrokinetisch injiziert werden. Die aufgetragene Probenmenge lässt sich nach Gleichung (24) berechnen.

$$m = (\mu_{eo} + \mu_{ep,i}) \cdot \frac{U \cdot \pi \cdot r^2 \cdot c_{eki} \cdot t_{inj}}{L} \quad [\text{g}] \quad (24)$$

Die aufgetragene Probenmenge lässt sich sowohl über die angelegte Spannung als auch über die Zeit variieren. Bei der elektrokinetischen Injektion sind infolge langsamer Diffusionsprozesse im Probengefäß die Injektionsdauer und Menge der aufgetragenen Probe nicht linear [22]. Daher sollten grundsätzlich eine niedrige Spannung und höhere Injektionszeiten verwendet werden, da so die Probenmoleküle im Probengefäß in das elektrische Feld nachdiffundieren können. Vergleicht man die Reproduzierbarkeit beider Injektionsverfahren, liefert die hydrodynamische Injektion bessere Ergebnisse als die elektrokinetische [22, 25, 26].

3 Massenspektrometrie

Der Einsatz eines Massenspektrometers als Detektor nach einer CE-Trennung verspricht einige Vorteile. Dazu zählen die Möglichkeit zur Identifizierung der Analyten über ihre Masse, die Trennung koeluierender Substanzen und, in den meisten Fällen, eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zur UV-Detektion.

3.1 Instrumenteller Aufbau

Die Massenspektrometrie beruht auf der Trennung von Ionen in der Gasphase aufgrund ihres unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z). Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus drei Abschnitten:

- I. der Ionenquelle, in der die Probenmoleküle ionisiert und in die Gasphase überführt werden,
- II. dem Analysator, in dem die Auftrennung der Ionen erfolgt und
- III. dem Detektor (mit Datenverarbeitung), der die Ionen detektiert und in Signale zur Datenauswertung umwandelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde größtenteils mit Elektrospray-Ionisierung und Quadrupol-Analysatoren gearbeitet. Daher wird nur diese Variante der Ionenquelle bzw. des Analysators ausführlich beschrieben.

3.1.1 Ionenquelle / Ionisierung

Die Elektrospray-Ionisierung (ESI) gehört zu den „atmospheric pressure ionization“ (API) Verfahren, bei denen die Ionisierung bei normalem Luftdruck stattfindet.

Dabei werden die in Lösung vorliegenden Moleküle und Ionen mit Hilfe einer angelegten Hochspannung (3-5 kV) versprüht, in die Gasphase überführt und anschließend in den Massenanalysator transferiert. Die Ionen werden im positiven Modus durch Anlagerung eines Protons $[M+H]^+$ bzw. Abspaltung eines Protons $[M-H]^-$ im negativen Modus gebildet. Bei größeren Molekülen kommt es auch zu Mehrfach(de)protonierungen, so dass im Massenspektrum mehrere Peaks derselben

Substanz mit unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnissen zu finden sind. So ist es möglich, sehr große Moleküle (z.B. Proteine) zu bestimmen, obwohl ihr Masse-Ladungs-Verhältnis bei einfacher Protonierung oberhalb des Messbereichs einiger Analysatoren (z.B. Quadrupol, m/z 2 - 2000) liegt. Durch den steigenden Protonierungsgrad sinkt der m/z -Wert der Moleküle, so dass die Ionen in den Messbereich fallen.

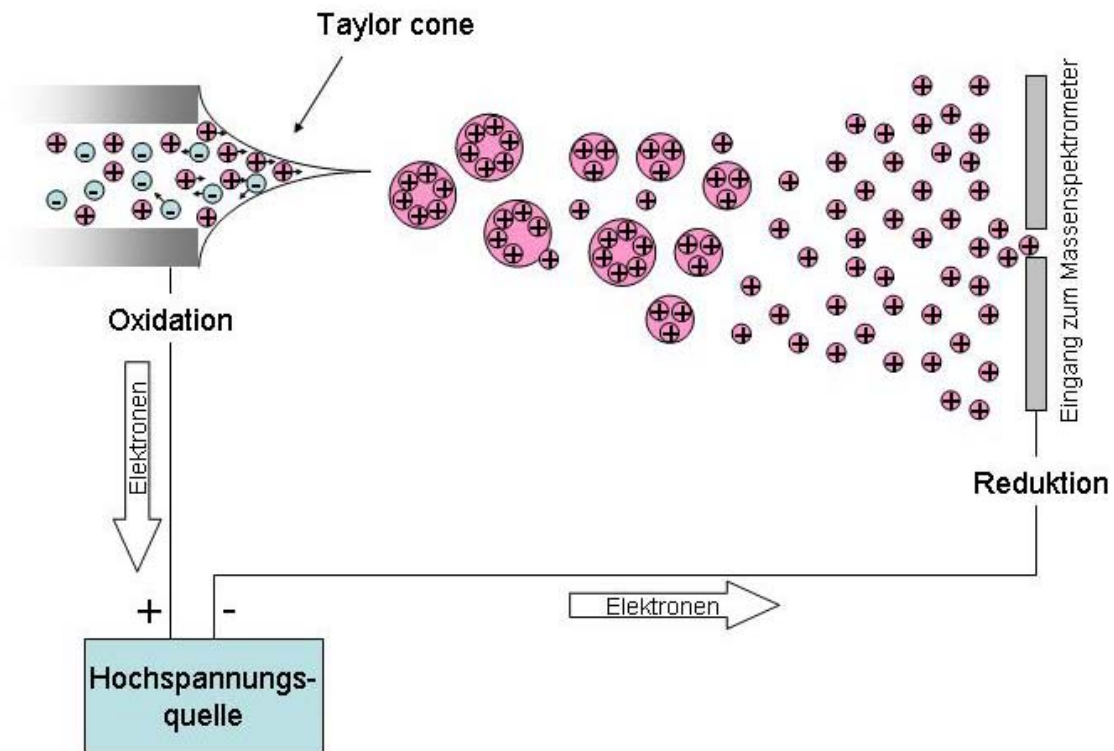


Abb. 3.1.1-1: Schematische Darstellung einer Elektrospray-Ionenquelle im positiven Modus nach KERBALE et al. [27].

Wie bei der CE beruht auch die Konstruktion der Elektrospray-Ionenquelle auf einer elektrolytischen Zelle [28], mit dem Unterschied, dass das leitende Medium nicht flüssig ist. An eine leitende Kapillare wird eine Hochspannung angelegt. Dadurch entsteht ein elektrisches Feld, unter dessen Einfluss sich die Ionen in Abhängigkeit von ihren elektrophoretischen Mobilitäten in verschiedene Richtungen bewegen. Wird wie in Abbildung 3.1.1-1 im positiven Ionenmodus gearbeitet, werden die Anionen zur Injektionsöffnung, die Kationen in Richtung der zum Massenspektrometer weisenden Kapillaröffnung bewegt [28]. Außerdem entstehen Hydroniumionen, deren Quelle die von der hohen Spannung ausgelösten Oxidationsvorgänge sind. Generell wird immer der Lösungsbestandteil mit dem

geringsten Redoxpotential zuerst oxidiert, das ist meist Wasser ($6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{ H}_3\text{O}^+ + 4 \text{ e}^-$) [28]. An der Kathode kommt es folglich zu Reduktionsprozessen. Wird die Quelle im negativen Modus betrieben, so sind die Orte der Oxidation und Reduktion vertauscht.

Nach dem Verlassen der Kapillare hält die Oberflächenspannung des Lösemittels die Flüssigkeit zusammen. Bei ausreichend hohen Spannungen bildet sich an der Spitze aus der Analysenlösung ein als „Taylor cone“ bekannter Kegel aus, an dessen Spitze die so genannte „jet-region“ liegt. Zu beachten ist, dass die Lösung nach außen positiv geladen ist, da die Anionen in Richtung Anode migriert sind [29] oder oxidiert wurden. In der „jet-region“ ist die Ladungsdichte so hoch, dass die Abstoßungskräfte der Kationen nicht mehr von der Oberflächenspannung kompensiert werden. Daher spalten sich kleine Tröpfchen ab. Durch den Oberflächenzuwachs bei der Tropfenbildung können sich die Ladungen besser verteilen, wodurch die Abstoßungskräfte innerhalb des Tropfens reduziert werden. Das entstehende Spray besteht somit aus nach außen positiv geladenen Tröpfchen, deren Bewegung zum Eingang des Massenspektrometers gerichtet ist [28]. Die Tröpfchen tragen an ihrer Oberfläche den positiven Ladungsüberschuss (Hydroniumionen, die von der Kathode angezogen werden [30]), während im Tropfeninneren Neutralsalze und ungeladene Moleküle lokalisiert sind [29] (siehe Abb. 3.1.1-3).

Die Tropfen werden durch Lösemittelverdunstung immer kleiner, so dass die Ladungen trotz ihrer gleichen Polarität näher zusammenrücken müssen. Ist der Punkt erreicht, an dem die elektrostatische Abstoßungskraft gleich der Oberflächenspannung des Tropfens ist, spricht man vom „Rayleigh stability limit“. Bei weiterer Vergrößerung der Abstoßungskraft bilden sich mehrere Tochtertropfen, die ca. 1.0 – 2.3% der Masse, 10 - 18% der Ladung und etwa 1/10 des Radius des Muttertropfens besitzen [31]. Diesen Prozess nennt man „Coulomb Fission“ („Coulomb Spaltung“). Interessant ist, dass in den Tochtertropfen zwar das Masse-Ladungs-Verhältnis höher als im Muttertropfen ist, da die Gesamtladung aber über eine größere Oberfläche verteilt wird, sinkt die Ladungsdichte und damit die gegenseitige Abstoßung an der Tropfenoberfläche.

Für den endgültigen Übergang der Ionen in die Gasphase werden zwei verschiedene Mechanismen postuliert. Im Ersten wird davon ausgegangen, dass es durch eine Serie von Tropfenspaltungen zur Bildung von Tropfen kommt, die nur noch ein

einziges Analytmolekül enthalten. Nach der völligen Verdunstung des Lösemittels kommt es schließlich zur Übertragung der Tropfenoberflächenladungen auf das Molekül und zum Übergang des Ions in die Gasphase. Diesen Mechanismus bezeichnet man als „charge residue model“ (CRM).

Das zweite Modell wird „ion evaporation mechanism“ (IEM) genannt. Es wird davon ausgegangen, dass sobald eine gewisse Tropfengröße unterschritten wird, solvatisierte Ionen direkt von der Tropfenoberfläche emittiert werden. Dieses wird mit der ausreichend hohen Abstoßungsenergie kurz vor Erreichen des „Rayleighlimit“ erklärt.

Der Hauptunterschied zwischen beiden Modellen liegt also in der Erklärung, wie die Analytmoleküle von den anderen Molekülen in der Lösung getrennt werden. Im CRM findet die Trennung durch mehrere Tropfenspaltungen, die letztendlich zu einem ein Molekül und Überschussladung enthaltenden Tropfen führen, statt. Dagegen besagt die IEM, dass die Trennung durch den Ausstoß einzelner Moleküle inklusive Ladungen aus der Tropfenoberfläche und somit mit einer gleichzeitigen Reduktion der Gesamtoberflächenladungsdichte vonstatten geht. Es besteht ein Konsens, dass Ionen großer Moleküle (z.B. von Proteinen) nach dem CRM gebildet werden, während bei kleineren Analyten noch keine Einigkeit besteht. Es gibt allerdings Hinweise, sie würden hauptsächlich nach dem IEM gebildet [32, 33]. Angezogen von der Kathode und dem Vakuum gelangen die Ionen teilweise in den Analysator, wobei einige Ionen auch auf die Kathode prallen und neutralisiert werden. Daher ist eine vollständige Übertragung aller Analytmoleküle in das Massenspektrometer nur bei gut positionierten Nanosprays möglich. Bei konventionellen Massenspektrometern liegt die Transmission der Ionen zum Detektor bei maximal 10% [34].

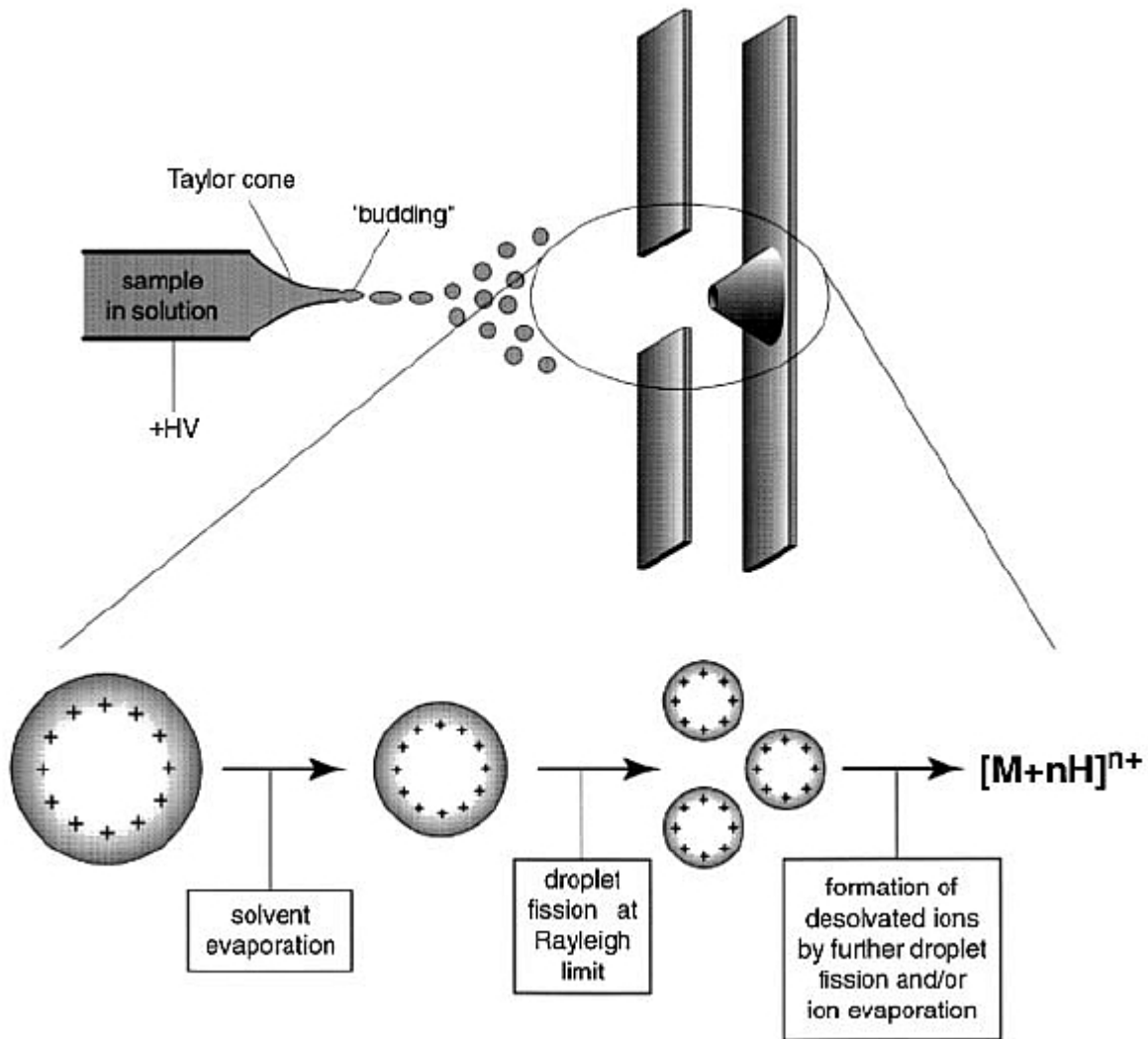


Abb. 3.1.1-2: Die Entstehung von Tröpfchen und anschließende Ionisierung der Analyten aus [35]. Unter „budding“ wird der Prozess in der „jet-region“ verstanden, bei dem die elektrostatischen Kräfte die Oberflächenspannung der Taylor cone überwiegen und sich kleine Tröpfchen abspalten.

In der Regel wird das Versprühen der Analysenlösung durch Zufuhr eines „nebulizer gas“ (häufig Stickstoff) unterstützt. Durch die Zuführung des erwärmten Gases sind höhere Flussraten möglich, da die Verdunstung des Lösemittels beschleunigt wird. Bei manchen Ionenquellen ist ein weiterer Gasstrom, das Trocknungsgas („drying gas“) zu finden. Es dient ausschließlich der Erhöhung der Lösemittelverdunstung.

Die Ionisationseffizienz bei der ESI ist einerseits von der Flussrate des nebulizer gas, in viel größerem Maße aber von der Flussrate der Analysenlösung abhängig [36]. Aus dieser Erkenntnis wurde eine Variante der Elektrospray-Ionisierung entwickelt, die ohne nebulizer gas auskommt und Nanospray genannt wird [28]. Beim Nanospray werden Flussraten bis zu 100 nl/min eingestellt, so dass von Anfang an

kleine Tröpfchen entstehen, die sich durch ein höheres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis auszeichnen. Das führt einerseits zu einer erhöhten Konzentration von Analytmolekülen an der Oberfläche im Vergleich zu größeren Tropfen, andererseits durch den höheren Oberflächenanteil zu einer verbesserten Lösemittelverdunstung. Beide Faktoren bewirken eine insgesamt höhere Ionisierungsausbeute.

Dazu kommt ein geringerer Spraydurchmesser durch die Verwendung einer Kapillare mit kleinerem Innendurchmesser, so dass der Verlust beim Transfer in den Analysator reduziert wird. Daher ermöglicht die Verwendung von Nanospray-Ionenquellen eine erhöhte Empfindlichkeit und ein höheres Signal-Rausch Verhältnis bei gleicher Analytkonzentration [37].

Elektrospray-Ionisierung ist eine der schonendsten Ionisationstechniken. Im Gegensatz zu harten Ionisationstechniken, wie der Elektronenstoß Ionisierung (EI), treten fast keine Molekülfragmentierungen bei der Ionisierung auf. Mit dieser Technik ist es daher möglich große Moleküle (z.B. Proteine) als Ganzes zu ionisieren, in die Gasphase zu überführen und massenspektrometrisch zu vermessen.

3.1.1.1 Signalunterdrückung („ion suppression“)

Unter „ion suppression“ versteht man die Reduktion der Signalintensität des Analyten im Massenspektrum durch Begleitsubstanzen aus der Lösung. In Extremfällen ist eine Detektion der gewünschten Ionen nicht mehr möglich.

Bei der ESI liegt der Analyt in Lösung im elektrisch geladenen Tropfen vor. Durch Lösemittelverdunstung werden dann die Überschussladungen der Tropfenoberfläche auf die Analytmoleküle übertragen und diese so in die Gasphase gebracht. Ein Vergleich mit der „atmospheric pressure chemical ionization“ (APCI), bei der die Ionen erst in der Gasphase gebildet werden, zeigt, dass Gasphasenreaktionen nur für einen geringen Teil von Suppressionseffekten verantwortlich sind, da sie bei der APCI nur in geringem Ausmaß auftreten [38]. Die Ursache für Ionenunterdrückung muss also bereits bei der Tröpfchenbildung und der anschließenden Lösemittelverdunstung liegen.

Mit steigender Oberflächenaktivität von Molekülen erhöhen sich auch ihre Signalintensitäten, sie werden also im Vergleich zu weniger oberflächenaktiven Molekülen bevorzugt ionisiert [32]. Liegen nun ein Analytmolekül und ein weiteres,

oberflächenaktiveres Molekül in einem Tropfen vor, so konkurrieren sie um die limitierte Überschussladung an der Oberfläche. Aufgrund seiner molekularen Struktur liegt das oberflächenaktivere Molekül näher an der Phasengrenze flüssig/gasförmig, während das eigentliche Analytmolekül ins Tropfeninnere gedrängt wird. Damit ist es wahrscheinlicher, dass das oberflächenaktivere Molekül in die Gasphase übergeht und einen Großteil der Ladungen „mitnimmt“ [39]. Da nun der Ladungsüberschuss auf der Tropfenoberfläche geringer ist, kommt es zu keiner weiteren Desorption oder Coloumb Fission mit der Konsequenz, dass das Analytmolekül nicht in die Gasphase übergehen kann und im Massenspektrum nicht erscheint [40].

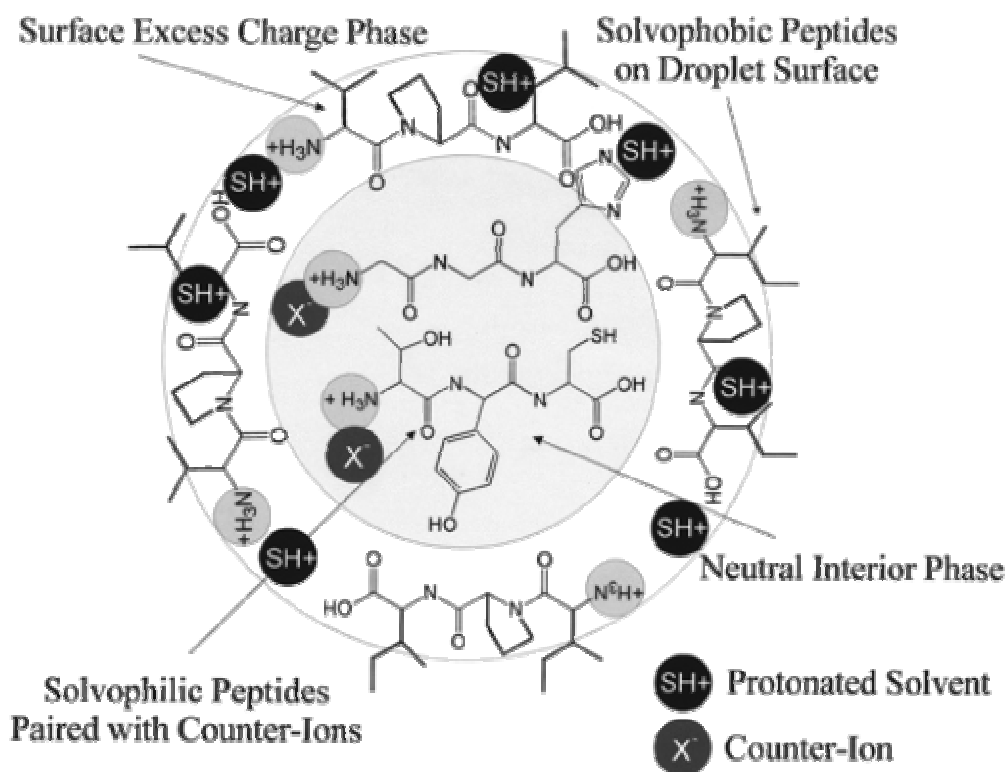


Abb. 3.1.1-3: Die Verteilung unterschiedlich oberflächenaktiver Peptide in einem ESI-Tropfen. Die Peptide mit unpolaren Seitenketten halten sich bevorzugt an der Tropfenoberfläche auf, während hydrophilere Peptide in das Innere gedrängt und ihre Ladung von Gegenionen neutralisiert werden. Sie sind somit nicht mehr als Ionen in die Gasphase zu überführen [40].

Ein weiterer Suppressionsfaktor sind nichtflüchtige Substanzen, die mit dem Analyten nichtflüchtige oder ungeladene und damit nicht detektierbare Präzipitate bilden [38]. Dazu zählen auch Elektrolyte, wie z.B. Phosphat oder Borat, die in der CE häufig als Puffersystem verwendet werden und daher bei der Kopplung beider

Systeme nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen benutzt werden können [41].

In ESI-Massenspektren sind Addukte aus Analyt und Natrium- bzw. Kaliumionen nicht ungewöhnlich [42]. Die Alkalikationen lassen sich nie aus der Lösung ausschließen, da insbesondere Natrium bei der Produktion von Reagenzien oder durch Glasbehälter in die Probe eingetragen werden kann. Durch die Anlagerung eines oder mehrerer Alkaliionen erhöht sich die Masse des Analyten nicht nur um ein Dalton, wie es bei der Anlagerung eines Protons der Fall wäre, so dass besonders bei Multianalyt-Lösungen die Identifizierung einzelner Substanzen erschwert sein kann.

3.1.2 Quadrupol-Analysator

In einem Massenanalysator werden die von der Ionenquelle produzierten Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt, so dass sie später einzeln detektiert werden können.

Damit ein kollisionsfreier Durchgang der aufzutrennenden Ionen gewährleistet und die Temperatur als störender Faktor (Brownsche Molekularbewegung) ausgeschaltet ist, muss im Analysator ein Vakuum anliegen. Im Falle eines Quadrupols sollte das Vakuum $\leq 10^{-4}$ Torr betragen, um eine „freie Flugstrecke“ von 50 cm (die ungefähre Länge des Analysators) sicherzustellen [43]. Die Flugbahn der Ionen ist dann nur noch von magnetischen und elektrischen Feldern abhängig.

Der Quadrupol-Analysator besteht aus vier kreuzförmig angeordneten Metallstäben, die als Elektroden dienen. An die Elektroden wird eine Gleichspannung mit einer überlagerten Wechselspannung oder Radiofrequenz (RF) angelegt, wobei jeweils gegenüberliegende Stäbe dieselbe, nebeneinander liegende die entgegengesetzte Polarität besitzen.

Tritt ein ionisiertes und durch eine Spannung beschleunigtes Masseteilchen in dieses Vierpolfeld ein, wird es durch die anliegende Frequenz in eine spiralförmige Flugbahn gebracht. Werden die Radien der Flugbahn des Masseteilchens zu groß, gerät es außerhalb des Vierpolfeldes und prallt auf die Quadrupolstäbe. Andernfalls bewegt es sich weiter auf einer Achse parallel zu den Zylindern. Durch Variation der Spannungen ist eine selektive Auswahl von Ionen unterschiedlicher Masse-Ladungs-

Zahl möglich, so dass man bei einem Quadrupol von einem durch Spannungsvariation beeinflussbaren Massenfilter sprechen kann.

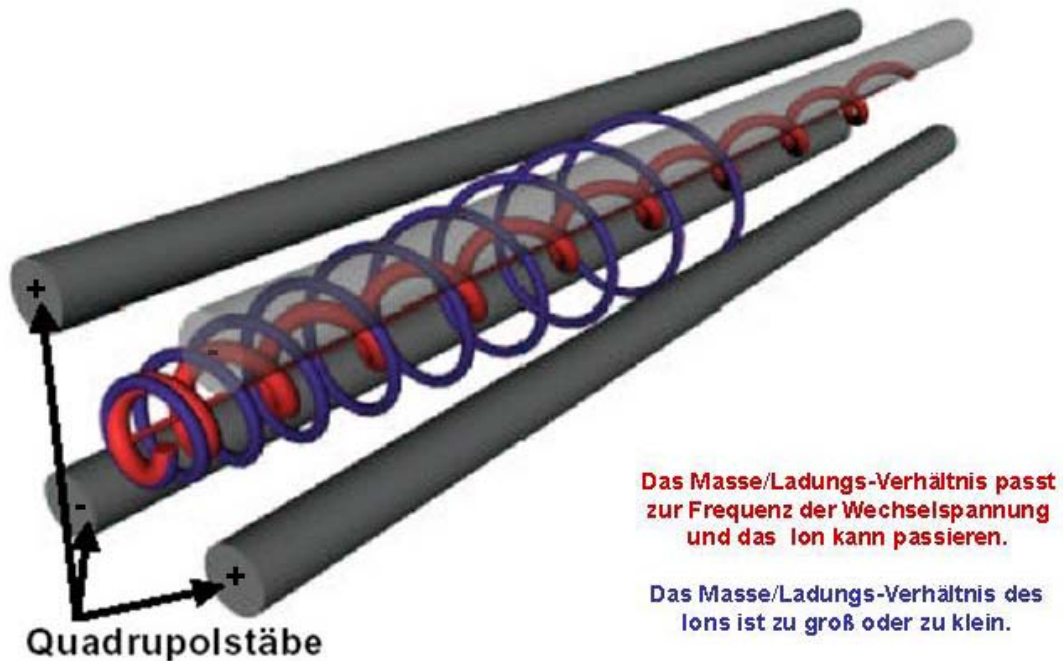


Abb. 3.1.2-1: Funktionsprinzip eines Quadrupol-Analysators. Vor den Quadrupolstäben liegt die Ionenquelle, im Anschluss der Detektor.

Die beiden positiv geladenen Stäbe fungieren als Hochpass-Massenfilter. Das bedeutet, dass Kationen, die von den Stäben abgestoßen und dabei beschleunigt werden, eigentlich problemlos zum Detektor gelangen müssten. Da der Gleichstrom aber von einem Wechselstromsignal überlagert ist, werden die Kationen durch den Wechsel von positiver und negativer Phase abwechselnd in die Mitte gedrückt, und dann wieder in Richtung der dann negativ geladenen Stäbe gezogen. Kationen mit hoher Masse reagieren träger auf die wechselnden Phasen, d.h. sie werden während der negativen Phase nicht so stark in Richtung der negativen Stäbe beschleunigt wie leichte Kationen. Das hat zur Konsequenz, dass leichte Ionen auf die negativ geladenen Stäbe prallen, dort neutralisiert werden und sich als neutrale Moleküle auf den Stäben ablagern oder von den Vakuumpumpen aus dem Analysator entfernt werden. So kommt es zu einer Filterwirkung, die leichte Ionen diskriminiert.

Die negativ geladenen Stäbe dienen als Tiefpass-Massenfilter, d.h. nur Ionen geringer Masse können passieren. Schwere Kationen werden beim Analysatordurchgang durch die Gleichspannung in Richtung der Elektroden

beschleunigt. Aufgrund ihrer Trägheit reicht die Dauer der positiven Phase der Wechsellspannung nicht aus, um sie wieder in die Mitte der Stäbe zu bringen, so dass diese Kationen trotz der positiven Phase auf die Stäbe prallen und in der nächsten negativen Phase neutralisiert werden.

Ionen, die einen Quadrupol passieren, dürfen also weder zu schwer noch zu leicht sein, um nicht herausgefiltert zu werden. So entsteht ein Schmalbandfilter, dessen Durchlässigkeit sich für bestimmte m/z -Werte durch Verändern der angelegten Spannung variieren lässt [43].

Eine wichtige Eigenschaft der Quadrupol-Analysatoren ist die Fähigkeit zum „selected ion monitoring“ (SIM). Dabei wird nicht der gesamte mögliche Masse-Ladungs-Bereich, wie sonst üblich, abgetastet, sondern es werden immer nur die Spannungen angelegt, die nötig sind, um ein (oder mehrere) ganz bestimmte(s) Masse-Ladungs-Verhältnis(se) zu detektieren. So kann der Filter länger für die ausgewählten Ionen geöffnet bleiben, was die Empfindlichkeit erhöht. Deshalb wird dieser Operationsmodus bevorzugt bei Quantifizierungen verwendet. Zudem werden nur Matrixionen erfasst, die dasselbe Masse-Ladungs-Verhältnis wie der Analyt aufweisen, so dass insgesamt ein geringeres Rauschen resultiert.

Weitere Vorteile sind der im Vergleich zu anderen Analysatoren geringere Anschaffungspreis und Platzbedarf sowie die Robustheit. Normalerweise kann mit einem Quadrupol ein Massenbereich von 2 – 2000 m/z abgetastet werden.

Anders als in der CE ist bei der Massenspektrometrie die Auflösung ein Qualitätsmerkmal, das ausschließlich vom verwendeten Analysatortyp und dessen Einstellungen und nicht von MethodenvARIABLEN wie z.B. dem BGE abhängig ist. In der Massenspektrometrie betrachtet man zwei Peaks als getrennt, wenn sie sich in 10% oder weniger ihrer Höhe überlappen [44].

$$R = \frac{m_2}{m_2 - m_1}, m_1 < m_2 \quad (25)$$

Aus (25) geht hervor, dass mit der für einen Quadrupol-Analysator typischen Auflösung von 1000 [45], Ionen mit den m/z -Werten 1000 und 1001 oder 100.0 und 100.1 vollständig getrennt werden.

3.1.3 Ionendetektor

Der Ionendetektor arbeitet nach dem Prinzip des Sekundär-Elektronenvervielfachers, bei dem die Ionen auf eine Elektrode (genannt Dynode) entgegen gesetzter Polarität treffen. Da die Dynode immer nur eine Polarität haben kann, ist es immer nur möglich in einem Ionenmodus zu messen und somit entweder nur Kationen oder nur Anionen zu detektieren. Diese Dynode ist mit einer Metalllegierung überzogen, aus der beim Auftreffen energiereicher Ionen eine Lawine an Sekundärelektronen austritt. Werden mehrere Dynoden hintereinander geschaltet, wobei die angelegte Spannung steigt, kann man ausgehend von einem Ion eine Elektronenkaskade auslösen, mit der das Ausgangssignal verstärkt wird. Ionen aus einem Quadrupol weisen eine relativ geringe kinetische Energie auf und müssen elektromagnetisch beschleunigt werden, bevor sie auf die erste Dynode treffen, um die Elektronenlawine auszulösen [43]. Am Ende des Detektors treffen die Elektronen dann auf eine Anode, an welcher der entstehende Stromfluss gemessen und in digitale Signale umgewandelt wird. Anschließend werden die Intensitäten aller Ionen mit computergestützter Datenaufnahme aufgezeichnet.

Üblicherweise wird ein bestimmter m/z -Bereich, z.B. 50-700, mehrfach komplett abgefahren und die einzelnen Spektren gespeichert. Nachdem die Signalintensitäten der einzelnen Massenscandurchläufe summiert und die erhaltenen Totalionenstromsummen mit der Messzeit in Bezug gesetzt wurden, erhält man bei Kopplung mit der CE das Totalionenstromelektropherogramm (TIE). Bei der Verwendung des SIM Modus werden analog die Einzelspektren der ausgewählten Masse-Ladungs-Zahl(en) addiert.

4 Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie

Bei der CE werden am häufigsten UV- oder Fluoreszenz-Detektoren eingesetzt. Die Verwendung eines Massenspektrometers birgt einige Vorteile, wie z.B. die Unabhängigkeit von einem Chromo- oder Fluorophor, in den meisten Fällen eine höhere Empfindlichkeit [46], die Möglichkeit über Fragmentierungen Informationen zur Molekülstruktur zu erhalten und, bei koeluierenden Substanzen, die Möglichkeit zur Trennung über das Masse-Ladungs-Verhältnis (zweite Trenndimension).

Grundsätzlich ist die Ionisierung von Analyten durch Elektrospray zur Quantifizierung möglich, denn obwohl die relativen Ionenintensitäten in einem ESI-Massenspektrum in den wenigsten Fällen den relativen Konzentrationen der Ionen in Lösung entsprechen [47], handelt es sich bei diesem Ionisierungsverfahren in weiten Bereichen um einen konzentrationsabhängigen Vorgang [36, 48].

Bei der ESI entstehen hauptsächlich pseudomolekulare Ionen vom Typ $[M-H]^-$ oder $[M+H]^+$ (je nach Polarität der ESI-Spannung), so dass dieses Ionisierungsverfahren sehr gut zur Kombination mit der CE, bei der derartig geladene Moleküle bereits in Lösung vorliegen, geeignet ist.

Die zur Kopplung von MS mit der CE verwendeten Interfaces haben ihren Ursprung in der weit verbreiteten und vielfach zur Quantifizierung eingesetzten HPLC-ESI-MS. Obwohl die für Quantifizierungen zu beachtenden Geräteparameter in vielerlei Hinsicht ähnlich sind, gilt es bei der Kopplung von CE und MS zwei Probleme zu überwinden, die bei HPLC-MS nicht auftreten. Das erste ist die unabhängige Spannungsregelung zweier Systeme, die jeweils für sich eine elektrolytische Zelle darstellen. Während bei einigen kommerziellen Systemen die Entkopplung beider Stromkreise gelungen ist, muss bei anderen Herstellern auf der CE-Seite immer mit einer Spannungsminderung um den bei der Ionisation eingestellten Betrag (3-5 kV) gearbeitet werden [49]. Das hat zur Folge, dass sich bei jeder Änderung der Sprayspannung auch die effektive Spannung an der Kapillare, die Feldstärke und damit die Stärke des EOF ändert (Gleichung (5)).

Ein weiterer Unterschied ist die Flussrate von HPLC und CE. Sie ist bei der CE mit ungefähr 20 - 200 nl/min [49] sehr viel geringer als bei der HPLC. Mit den meisten CE-MS-Interfaces ist es bei einer so niedrigen Flussrate nicht möglich ein stabiles

Elektrospray zu erzeugen. Daher wird bei den meisten Interfacekonstruktionen noch zusätzlich Flüssigkeit („sheath liquid“) zu dem Elektrolytfluss aus der Kapillare gemischt. Man nennt diesen zusätzlichen Fluss „sheath-flow“, der noch eine weitere Aufgabe erfüllt: Die Trennkapillare besteht aus einem nicht leitenden Material, so dass der Stromkreis im ESI-Interface nicht geschlossen ist. Über das sheath liquid wird eine leitende Verbindung zwischen der Analysenlösung aus der Kapillare und der Elektrode des Interfaces hergestellt [49], die das Entstehen des Sprays erst ermöglicht.

4.1 Unterschiede im Geräteaufbau bei UV- und massensensitiver Detektion

Da es bislang keine in einem Gehäuse kombinierten Instrumente gibt, muss die Kapillare aus dem CE-Gerät heraus in das Interface geführt werden, was die Verwendung einer längeren Kapillare (mindestens 50 cm) notwendig macht. Dadurch verlängern sich die Analysenzeiten. Wird die Spannung nicht angeglichen, sinkt nach dem Methodentransfer von CE-UV auf CE-MS durch die längere Kapillare die Feldstärke in der Kapillare (13), was die Analysenzeit ebenfalls verlängert [50]. Außerdem ist ein Teil der Kapillare nicht thermostatisiert, so dass durch Joulesche Erwärmung oder Änderung der Raumtemperatur Schwankungen im EOF [51] oder verstärkte Konvektions- und Diffusionseffekte resultieren können [25]. Von eher theoretischer Natur ist, dass bei der Kopplung die effektive Kapillarlänge l der Gesamtlänge L der Kapillare entspricht, was beispielsweise bei der Berechnung der Mobilität zu berücksichtigen ist.

Wichtig beim Aufbau des Systems ist, dass beide Kapillarenden dieselbe Höhe haben, um einen Siphoneffekt zu vermeiden [49, 50].

4.2 Interfacetypen zur Kopplung von Kapillarelektrophorese mit Massenspektrometrie

Grundsätzlich können zwei verschiedene Basisdesigns bei den ESI Interfaces unterscheiden werden: Erstens die vorher erwähnten und am weitesten verbreiteten sheath-flow Interfaces [50] und die „sheathless“ Interfaces, die ohne sheath liquid auskommen.

Wie bereits erläutert, ist die Flussrate der CE nicht hoch genug, um ein ausreichend stabiles Spray zu produzieren. Daher wird sheath liquid sowohl zur „Flussratenerhöhung“, als auch als Stromleiter hinzugefügt. Um die Aufgabe als Leiter zu erfüllen, muss das sheath liquid Wasser und Elektrolyte enthalten. Bestehen sie aus 100% organischem Lösemittel, wie z.B. Isopropanol, ist aufgrund der mangelnden Leitfähigkeit kein stabiles Spray möglich. Andererseits verbessert ein Zusatz von organischen Lösemitteln die Flüchtigkeit des sheath liquid und damit die Ionisierungseffizienz des Systems. Da das sheath liquid außerdem noch die Funktion des Auslasspuffers übernimmt [52], sollten die gewählten Elektrolyte ein Puffersystem bilden und mit der Zusammensetzung des BGE übereinstimmen (Kap. 6.2.2).

Die sheath-flow Interfaces können je nach der Zuführung des sheath liquid in zwei Kategorien unterschieden werden. Bei dem von SMITH et al. [5] entwickelten und heute am häufigsten eingesetzten [50, 53] „coaxial sheath liquid interface“ vermischt sich das sheath liquid mit dem BGE direkt in der Taylor cone (Abb. 4.2-2) [50].

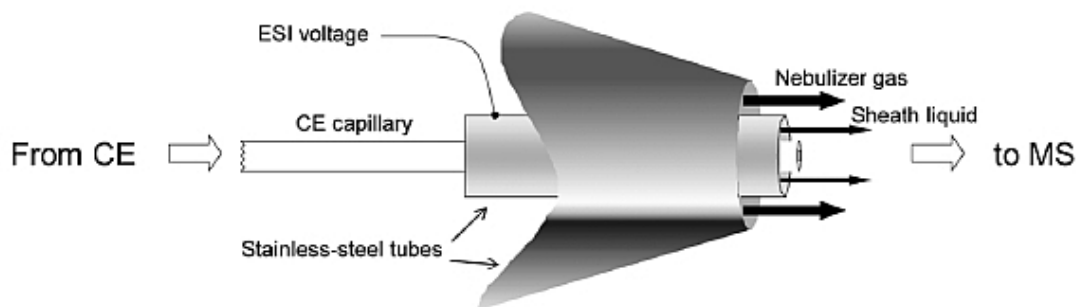


Abb. 4.2-1: Schematischer Aufbau eines „coaxial sheath liquid interface“ [54].

Die Abbildung 4.2-1 veranschaulicht den Aufbau dieses Typs, bei dem vereinfacht dargestellt drei „Röhren“ ineinander stecken. Die Innerste ist die Kapillare aus dem Kapillarelektrophoresegerät. Sie wird von hinten durch eine Stahlröhre in Richtung MS geführt. Durch den Raum zwischen der Kapillaraußenoberfläche und der Innenoberfläche dieser Stahlröhre wird das sheath liquid bis zur Taylor cone geführt (Abb. 4.2-2). Die äußerste Röhre dient der optionalen Zuführung des „sheath-“ oder „nebulizer gas“, um die Flüssigkeitsverdunstung zu beschleunigen.

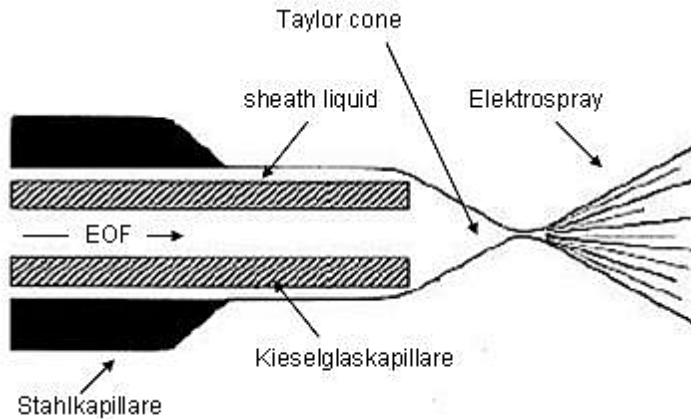


Abb. 4.2-2: Mischung von sheath liquid und BGE in der Taylor cone [50]. Die Röhre für die Zuführung des „nebulizer gas“ ist nicht abgebildet.

Die zweite Variante der sheath-flow Interfaces ist das „liquid-junction interface“, bei dem das sheath liquid über ein T-Stück zwischen der CE-Kapillare und der Spraykapillare zugeführt wird (Abb. 4.2-3), so dass sich die Flüssigkeiten bereits vor der Taylor cone vermischen.

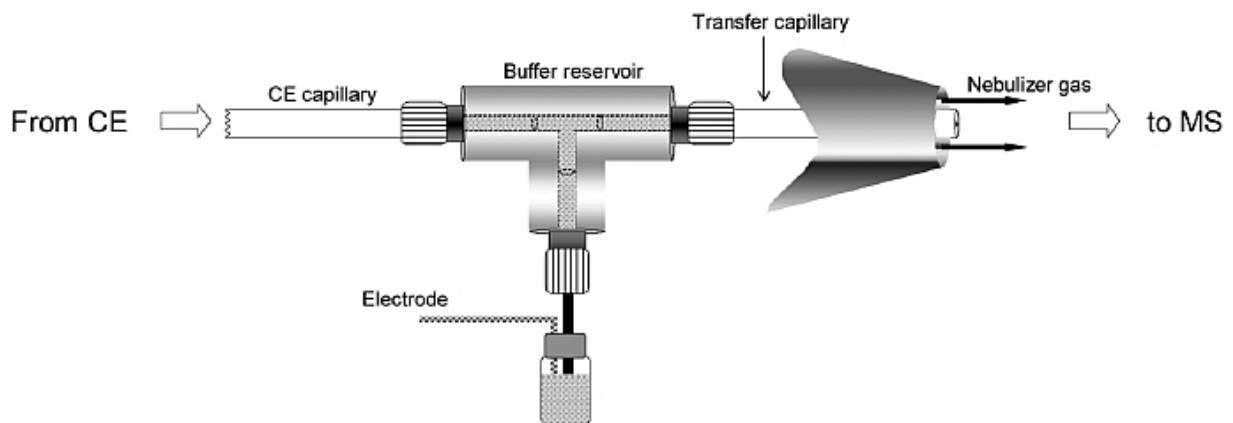


Abb. 4.2-3: Schematischer Aufbau eines „liquid junction interface“ nach [54].

Bei den 1987 von OLIVARES et al. eingeführten sheathless Konstruktionen wird, wie der Name schon sagt, auf die Flüssigkeit als Leiter verzichtet [4]. Die elektrische Verbindung wird über mit leitendem Material (z.B. Gold, Graphit) überzogenen Kapillaren, metallenen Verbindungen zwischen Trenn- und Spraykapillare oder seltener, über von außen in die Kapillare eingeführte Drähte gewährleistet. Bei dieser Bauart wird die niedrige Flussrate der CE nicht von außen erhöht, so dass man hier

von einer Nanosprayquelle sprechen kann. Dennoch sollten die Begriffe „Nanosprayquelle“ und „sheathless interface“ getrennt bleiben, denn der Terminus „Nanospray“ bezieht sich nur auf das Volumen und nicht auf die Herkunft oder Funktion der versprühten Lösung. Es existieren sheath liquid Interfaces, die aufgrund des geringen versprühten Gesamtvolumens den Nanosprayquellen zugeordnet werden.

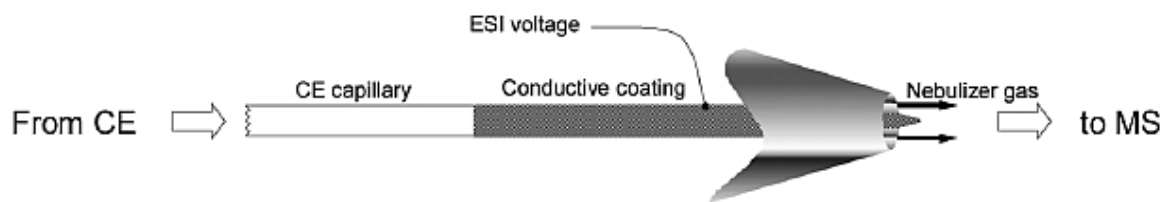


Abb. 4.2-4: Konstruktionsschema eines „sheathless interface“ nach [54].

4.3 Vor- und Nachteile der verschiedenen Interfacetypen

Das „coaxial sheath liquid“ Interface ist von allen Bauarten die robusteste [45]. Allerdings wird von Peakverbreiterungen, die durch den Vermischungsprozess an der Kapillarspitze ausgelöst werden, berichtet [49, 52, 55, 56]. Im Unterschied zu den anderen Designs wird hier die Trennkapillare auch gleichzeitig als Spraykapillare genutzt. Das hat den Vorteil, dass es keine Totvolumina an der Kontaktstelle von beiden Kapillaren gibt. Nachteilig an dieser Konstruktion ist allerdings, dass, um reproduzierbare quantitative Werte zu erhalten, die Schnittfläche der Kapillarspitze immer gleich sein muss. Bei den anderen beiden Systemen kann mittlerweile auf kommerziell erhältliche Sprayspitzen von einheitlicher Qualität zurückgegriffen werden [57].

Das liquid junction Interface bietet den Vorteil der elektrischen und physikalischen Trennung von CE und ESI, so dass beide Systeme unabhängig voneinander optimiert werden können. Bauartbedingt kommt es bei der Zumischung des sheath liquid zu einer Peakverbreiterung und damit zu einem Verlust an Trennleistung [52]. Im Vergleich zum sheathless Interface weisen beide sheath-flow Varianten eine niedrigere Empfindlichkeit auf. Die Ursache hierfür liegt im ESI-Prozess selbst, bei dem niedrigere Flussraten eine verbesserte Ionisierungseffizienz hervorrufen (vgl.

Kap. 3.1.1) und nicht bei der, wie oft behauptet, Verdünnung der Probe durch das zusätzliche Flüssigkeitsvolumen des sheath-flow [52].

Das sheathless Interface birgt einige Nachteile, welche die verbreitete Anwendung bisher verhindert haben. Um ein stabiles Spray zu erreichen, wird beim Nanospray mit angespitzten Spraykapillaren gearbeitet [52]. Die Lebensdauer der Sprayspitzen ist, abgesehen von der bereits erwähnten Kopplungsproblematik der getrennten Kapillaren, zum einen durch leichtes Verstopfen der Sprayspitze [57], sowie durch elektrochemische Reaktionen am leitenden Überzug [45] limitiert. SIMPSON und SMITH erwähnen eine reduzierte Trennleistung durch den entstehenden Druck innerhalb der sich verengenden Kapillare [55]. Außerdem ist die Positionierung des Sprays vor dem Eingang zum Analysator wegen des geringen Spraydurchmessers (zeit-)aufwendig.

In [58] wird ein so genanntes „low-flow-interface“ beschrieben, dass die Vorteile der sheath-flow und der sheathless Interfaces kombinieren soll. Allerdings gibt es noch keine Daten über die Präzision in der Analytik dieser Neuentwicklung.

Die Hauptursache für die fehlende Verbreitung der CE-MS in der Routinequantifizierung liegt bei allen Interfaces in der langfristigen Stabilität des Systems und der Problematik, besonders nach Kapillarwechseln, eine reproduzierbare Positionierung des Sprays vor dem Eingang des MS zu erreichen [50, 59, 60].

Um den Analysator des Massenspektrometers möglichst wenig mit Begleitsubstanzen zu kontaminieren, wurden im Lauf der Zeit verschiedene Transmissionswege für Ionen entwickelt. Die ersten ESI-Quellen sprühten noch direkt in die Öffnung des Analysators. Bei moderneren Entwicklungen ist die Sprühhichtung um 90° zum Eingang gedreht. So werden nur Ionen von der Elektrode in den Eingang gezogen, während ungeladene Teilchen und Tröpfchen aufgrund ihrer Trägheit weniger oder gar nicht beeinflusst werden. Beim „z-Spray“ müssen die Ionen einen z-förmigen Weg zum Eingang nehmen, wodurch eine noch bessere Abtrennung von z.B. ungeladener Matrix erfolgt.

5 Methodenvalidierung

Zur Methodenvalidierung in der pharmazeutischen Analytik wurden von der International Conference on Harmonization (ICH) Richtlinien herausgegeben, auf denen die meisten qualitätssichernden Bestimmungen und Anforderungen der arzneimittelzulassenden Behörden (z.B. EMEA, FDA) beruhen. In der ICH Qualitätsrichtlinie Q2 wird die analytische Validierung behandelt. Sie teilt sich in die Bereiche „Q2A: Definitionen und Terminologie“ und „Q2B: Methoden“ auf. Die folgenden Definitionen sind größtenteils der Richtlinie Q2A [61] entnommen.

5.1 Definitionen

5.1.1 Validierung analytischer Methoden

Das Ziel der Validierung einer analytischen Methode ist die Dokumentation des Nachweises, dass die validierte Methode zuverlässig innerhalb definierter Bedingungen zum erwarteten Ergebnis führt.

In der Analytik können Methoden für drei verschiedene Bereiche der Quantifizierung validiert werden. In dieser Arbeit werden nur Methoden des Typs 1, Methoden zur Bestimmung von Hauptkomponenten, verwendet. Außerdem können Methoden noch auf die Quantifizierung von Nebenkomponten validiert werden, beispielsweise bei der Bestimmung von Verunreinigungen eines Wirkstoffs. Beim dritten Typ ist es hingegen nicht nötig eine präzise Aussage zur Konzentration von Nebenkomponten zu machen, da es sich um eine Grenzprüfung des Verunreinigungsmusters handelt.

Um die Leistungsfähigkeit einer quantitativen Methode, bei der nur die Hauptkomponenten einer Probe zu bestimmen sind, zu demonstrieren, sollten unter anderem die folgenden Parameter verwendet werden.

5.1.2 Präzision

Die Präzision einer analytischen Methode ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung unter den gleichen Bedingungen.

Sie kann als Varianz $\hat{\sigma}^2$ (27), Standardabweichung $\hat{\sigma}$ (28) oder relative Standardabweichung $RSD\%$ (29) einer Messserie angegeben werden. Das „Dach“ über dem σ zeigt an, dass es sich nicht um den wahren Wert aus der Grundgesamtheit, sondern nur um einen Schätzwert aus einer Stichprobe handelt. So ist eine Unterscheidung zwischen der Standardabweichung der Grundgesamtheit σ und der Standardabweichung einer Stichprobe $\hat{\sigma}$ möglich. In der Praxis ist die Bestimmung von σ einer Methode nicht realisierbar, da unendlich viele Proben untersucht werden müssten.

Eine Stichprobe, z.B. eine Messserie, wird durch Lage- und Streumaße beschrieben. Der am weitesten verbreitete Schätzer für das Lagemaß ist der arithmetische Mittelwert \bar{x} , der Quotient aus der Summe aller Werte x_i und deren Anzahl n (26).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (26)$$

Um die Streumaße einer Stichprobe zu beschreiben, werden hauptsächlich die Varianz (27), die Standardabweichung (28) oder die relative Standardabweichung (29) verwendet.

Zur Berechnung der Varianz wird die Summe aus den quadrierten Differenzen von jedem Einzelwert x_i und dem Mittelwert \bar{x} gebildet. Anschließend wird durch die um eins reduzierte Anzahl der Werte n geteilt (27).

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (27)$$

Die Umrechnung der Varianz in die Standardabweichung erfolgt durch Ziehen der Wurzel (28). Sie beschreibt die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert.

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}^2} \quad (28)$$

Die relative Standardabweichung $RSD\%$ (29) eignet sich sehr gut zum Vergleich der Präzision zweier Methoden oder Techniken, da sich durch die Division mit dem Mittelwert das Ausmaß der Schwankung um \bar{x} besser beurteilen lässt. Bei der Verwendung von $\hat{\sigma}$ würden hohe Werte für x_i automatisch zu einem hohen Wert der Standardabweichung führen. Im englischen Sprachgebrauch wird dieser Parameter oft auch als „coefficient of variation“ (CV) bezeichnet.

$$RSD\% = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (29)$$

Die folgenden Definitionen stammen größtenteils von WÄTZIG et al. in [62]:

In der Regel werden vier Präzisionsebenen unterschieden, die Systempräzision, die Wiederholpräzision, die Intermediate Precision (der englische Begriff hat sich im Deutschen durchgesetzt) und die Vergleichspräzision.

Die Systempräzision (injection repeatability, system precision) wird durch wiederholte Messung derselben Probe(-lösung) bestimmt. Sie wird im Wesentlichen vom Messinstrument beeinflusst.

Unter Wiederholbedingungen wird die Wiederholpräzision (repeatability, $\hat{\sigma}_r$, $RSD\%_r$) ermittelt. Wiederholbedingungen liegen vor, wenn das gesamte Analysenverfahren, inklusive Probenvorbereitung, in einem Labor vom gleichen Operator mit demselben Messinstrument auf identisches, homogenes Testmaterial angewandt wird und die Messungen innerhalb eines kurzen Zeitraums nacheinander durchgeführt werden (innerhalb einer Serie, mit denselben Referenzstandards). Hier geht nur der Fehler für die Proben-, nicht aber für eine eventuelle Referenzmessung ein, da innerhalb einer Serie dieselben Analysenergebnisse des Referenzstandards verwendet werden.

Die Intermediate Precision oder Mehrtages-Standardabweichung (Intralabor-Standardabweichung, Labor-Vergleichspräzision) gibt die Streuung an, wenn die gleiche, vollständige Methode an verschiedenen Tagen, möglicherweise durch unterschiedliche Analytiker und mit unterschiedlicher Ausrüstung, aber innerhalb des gleichen Labors, durchgeführt wird. Dieses Präzisionsmaß berücksichtigt neben der Probenvariabilität (bei Kalibrierungen) die Streuung des Standards sowie, zusätzlich zur zufälligen Streuung, Einflüsse durch zeitliche Veränderungen (z.B. Temperaturschwankungen).

Die Ringversuchs-Standardabweichung (Interlabor-Standardabweichung, Vergleichspräzision, reproducibility) wird mit identischer Methode und identischem Testmaterial in unterschiedlichen Laboratorien ermittelt. Bei diesem Präzisionsmaß werden zusätzlich zur zufälligen Streuung der Analysenergebnisse besonders auch systematische Veränderungen durch äußere Einflussgrößen (z.B. Temperatur, Raumfeuchte, Reagenzienqualität, Ausbildungsstand des Laborpersonals etc.) berücksichtigt.

Über Monate und Jahre nähert sich die Mehrtages-Standardabweichung immer stärker der Vergleichs-Standardabweichung an, da auch innerhalb eines Labors über längere Zeiträume Personal und Instrumentierung wechseln. Daher wird der Begriff Vergleichs-Standardabweichung ($\hat{\sigma}_R$, $RSD\%_R$) auch übergeordnet verwendet.

5.1.3 Signal-Rausch-Verhältnis

Die Unruhe der Basislinie bei der Bestimmung von Blindproben nennt man Rauschen. Das Verhältnis der Höhe des Messsignals zum Mittelwert der Rauschsignale wird als Signal-Rausch-Verhältnis bezeichnet. Es wird meistens zur Bestimmung der Detektionsgrenze („limit of detection“ (LOD)), also der Analytkonzentration, bei der das Messsignal noch sicher vom Rauschen unterscheidbar ist, verwendet. Eine sichere Quantifizierung ist an der Detektionsgrenze in der Regel nicht mehr möglich, so dass es sich bei dieser Angabe um eine rein qualitative Aussage handelt. Zur Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird die Gleichung (30) verwendet [63].

$$S / N = \frac{2H}{h_n} \quad (30)$$

H entspricht der Höhe des gemessenen Signals von der Peakspitze bis zur Basislinie, während es sich bei h_n um den Mittelwert der Amplituden des Rauschsignals innerhalb von 20 Signalpeakbreiten handelt (vgl. Abb. 5.1.3-1). Eine Signalpeakbreite wird auf halber Peakhöhe $w_{0.5,i}$ bestimmt (vgl. Abb. 5.1.3-2). Alternativ kann h_n auch direkt aus dem Elektropherogramm, das den Probenpeak enthält, bestimmt werden [63].

Der Bereich der 20 Signalpeakbreiten bei $w_{0.5,i}$ muss nicht zwangsläufig symmetrisch um den Peak verteilt liegen. Um beispielsweise Matrixpeaks zu umgehen, kann er auch asymmetrisch platziert werden [62].

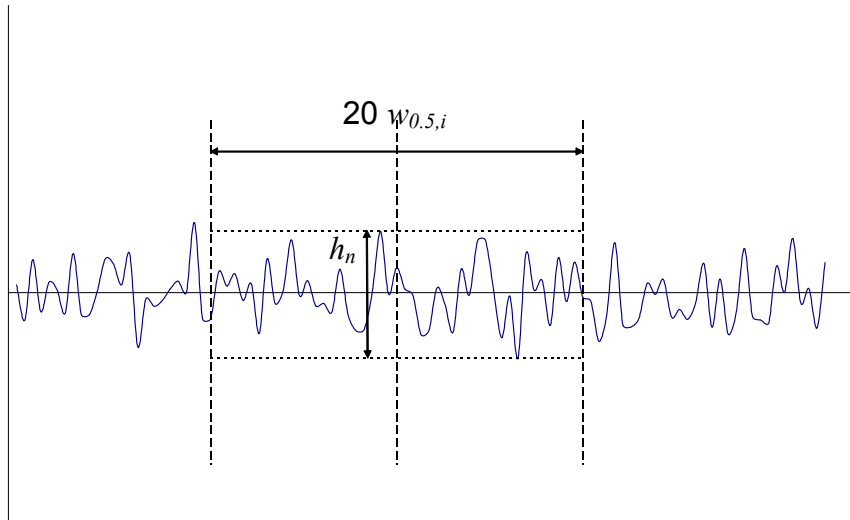


Abb. 5.1.3-1: Bestimmung des Rauschens aus dem Elektropherogramm einer Blindprobe.

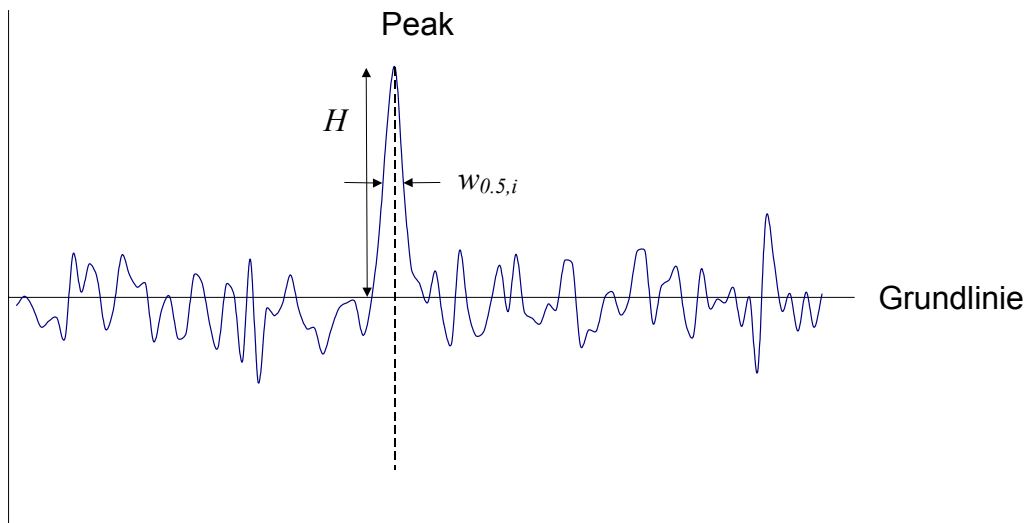


Abb. 5.1.3-2: Bestimmung der Peakhöhe in einem Elektropherogramm.

Um eine Substanz eindeutig nachzuweisen, muss das Signal der Substanz erkennbar größer als der Mittelwert der Rausch-Signale sein. Als Nachweisgrenze einer Substanz wird die Konzentration definiert, bei der ihr Signal den Mittelwert des Rauschens um ein Vielfaches, meist 2-, 3- oder 5-faches, an Intensität übertrifft.

In der Praxis werden unterschiedliche Formeln und Definitionen zur Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses und der Nachweisgrenze angewendet. Daher sollten bei Angaben des S/N und des LOD diese Werte ebenfalls genannt werden.

5.1.4 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode beschreibt den direkten proportionalen Zusammenhang zwischen der Probenkonzentration und dem Messsignal innerhalb eines bestimmten Messbereichs. Bei der Validierung einer Methode zur Quantifizierung sollte dieser Zusammenhang immer überprüft werden. Bei der graphischen Darstellung von fünf verschiedenen Messwerten aus dem Arbeitsbereich ist es visuell möglich zu entscheiden, ob ein linearer Zusammenhang besteht oder nicht. Liegen Messdaten von drei verschiedenen Konzentrationen vor, besteht eine Möglichkeit zur objektiven Bestimmung der Linearität im Vergleich der Steigungen der Geraden von der kleinsten zur mittleren und von der mittleren zur größten Konzentration. Unterscheiden sich beide Steigungen nicht signifikant, kann von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden [64].

5.2 Die statistische Beurteilung von Analyseergebnissen

Ergebnisse einer analytischen Methode werden bei der statistischen Beurteilung unabhängig von der verwendeten Datenzahl grundsätzlich als Stichprobe aus einer Grundgesamtheit gewertet. In den meisten Fällen kann bei einer Grundgesamtheit eine Normalverteilung der Werte angenommen werden, wobei ihre Dichtefunktion dann einer Gaußkurve entspricht. Die Messwerte der Stichprobe sind annäherungsweise normalverteilt, wobei sich die Dichtefunktion mit steigender Stichprobenzahl derjenigen der Grundgesamtheit immer mehr angleicht.

Die Dichtefunktion lässt sich durch den Mittelwert \bar{x} und die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ genau beschreiben, da \bar{x} die Fläche unter der Kurve in zwei gleich große Hälften teilt, während $\pm \hat{\sigma}$ die Messwerte zwischen den beiden Wendepunkten der Kurve einschließt.

Um mit Hilfe statistischer Testverfahren eine Aussage über Analysenmethoden treffen zu können, muss festgelegt werden, was genau bewiesen oder widerlegt

werden soll. Eine solche Aussage nennt man Nullhypothese H_0 . Bei dem Vergleich von Analysemethoden würde eine Nullhypothese z.B. „Es gibt keinen Unterschied zwischen den Streuungen zweier Messreihen“ lauten. Die Alternativhypothese ist das logische Gegenteil der Nullhypothese. In diesem Fall müsste sie lauten: „Die Streuungen zweier Messreihen unterscheiden sich“. Bei der Prüfung einer Nullhypothese besteht die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums. Daher muss noch die Irrtumswahrscheinlichkeit α einbezogen werden. Diese gibt an, wie oft aus der Beantwortung der Testfrage falsch auf die Nullhypothese geschlossen wird. So ist beispielsweise bei der Wahl von $\alpha = 0.05$ und der Annahme der Nullhypothese („Ja, es gibt keinen Unterschied“), diese Aussage in 5% der Fälle falsch und in 95% richtig. Wird die Aussage „Es gibt keinen Unterschied zwischen beiden Streuungen“ vom Test irrtümlich abgelehnt, spricht man von einem Fehler der 1. Art oder α -Fehler. Besteht ein Unterschied zwischen den Streuungen, der aber vom Test nicht erkannt wird, handelt es sich um einen Fehler der 2. Art oder β -Fehler.

Im eben beschriebenen Fall sind zwei Alternativhypothesen möglich: „ $\hat{\sigma}_1 < \hat{\sigma}_2$ “ oder „ $\hat{\sigma}_1 > \hat{\sigma}_2$ “. Daher handelt es hier um einen zweiseitigen Test. Da in zweiseitigen Tests irrtümliche Abweichungen in beide Richtungen berücksichtigt werden müssen, sind hier die tabellierten Grenzen weiter gefasst als bei einseitigen Tests mit gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit.

5.2.1 F-Test

Um die Präzision von Analysemethoden über deren Standardabweichungen zu vergleichen, verwendet man den F-Test. Bei diesem Verfahren wird der Quotient T_F der Varianzen (größere Varianz im Zähler, die kleinere im Nenner) gebildet (31) und mit einem tabellierten Wert $F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$ oder F_{tab} verglichen. Ist T_F größer als der tabellierte Wert, liegt ein signifikanter Unterschied in der Präzision beider Methoden vor.

$$T_F = \frac{\hat{\sigma}_1^2}{\hat{\sigma}_2^2} \quad (31)$$

Da besonders bei kleinen Datenzahlen die Streumaße verschiedener Stichproben stark schwanken können, müssen sie sich stark voneinander unterscheiden, bevor eine Differenz mit Hilfe des F-Tests als signifikant erkannt werden kann. Der

notwendige Unterschied ist dabei so hoch, dass ein Ergebnis „Die beiden Präzisionen unterscheiden sich nicht signifikant“ eine geringe Aussagekraft hat.

In einem Beispiel verglichen WÄTZIG et al. zwei Varianzen mit je $n = 3$, um die geringe Aussagekraft kleiner Datenzahlen zu demonstrieren [62]. Der tabellierte Wert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0.1$, also 10%, und je zwei Freiheitsgraden ist 9.000. Das bedeutet, da der Quotient beider Varianzen verglichen wird, dass $\hat{\sigma}_1^2$ maximal neunmal größer als $\hat{\sigma}_2^2$ sein darf, ohne dass ein signifikanter Unterschied festgestellt wird.

Durch einen so großen Toleranzbereich steigt die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 2. Art (β -Fehler). Wirklich unterschiedliche Varianzen können durch die zufallsbedingte Streuung nicht mehr unterschieden werden. Zur Verringerung des β -Fehlers kann einerseits die Datenzahl erhöht, andererseits aber auch ein größerer α -Fehler zugelassen werden, da ein größerer α -Fehler einen kleineren β -Fehler bewirkt.

Wie bereits erläutert, ermöglichen kleine Datenzahlen nur eine vage Aussage über die wirkliche Unsicherheit. Der Vertrauensbereich für die wahre Standardabweichung lässt sich mit Gleichung (32) bestimmen [62]:

$$\frac{1}{\sqrt{F_{n-1,\infty,1-\alpha/2}}} \cdot \hat{\sigma} \leq \sigma \leq \hat{\sigma} \cdot \sqrt{F_{\infty,n-1,1-\alpha/2}} \quad (32)$$

Bei Anwendung von Gleichung (32) zeigt sich, dass etwa 20 Messungen notwendig sind, um zu einer einigermaßen zuverlässigen Aussage zu kommen. Aber auch dann unterscheiden sich relative Standardabweichungen von beispielsweise 1.7% und 2% laut F-Test noch nicht signifikant [62].

5.2.2 t -Test

Für die Beurteilung der Qualität einer Methode ist der Mittelwert, ein Lagemaß, ausschlaggebend. Um die Mittelwerte zweier Messserien zu vergleichen, wird die Grundform des t-Tests verwendet. Dazu muss zunächst mit dem F-Test bewiesen werden, dass sich die Varianzen nicht signifikant unterscheiden und somit eine

Homogenität der Streuung vorliegt. Dann wird die mittlere Standardabweichung beider Messserien nach Gleichung (33) bestimmt:

$$\hat{\sigma}_m = \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_1^2 \cdot (n_1 - 1) + \hat{\sigma}_2^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (33)$$

Anschließend wird nach Gleichung (34) die Testgröße T_t ermittelt:

$$T_t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\hat{\sigma}_m} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (34)$$

Wie beim F-Test wird T_t mit einem tabellierten Wert t verglichen. Ist T_t kleiner als t , wird der Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten als zufällig angesehen. Ein Unterschied zwischen den Mittelwerten ist also statistisch nicht nachweisbar. Eine Möglichkeit zur Anwendung des t-Tests bei unterschiedlichen Varianzen wurde in [64] beschrieben.

Analog zur Berechnung des Vertrauensbereichs der wahren Standardabweichung nach (32) kann auch die Unsicherheit einer Mittelwertbestimmung aus einer Stichprobe durch den Vertrauensbereich $cnf(\bar{x})$ angegeben werden (35) [62]:

$$cnf(\bar{x}) = \bar{x} \pm t_{n-1, \alpha/2} \cdot \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{1}{n}} \quad (35)$$

Die Lage des Vertrauensbereichs wird durch den Mittelwert \bar{x} bestimmt. Die Unsicherheit der Bestimmung ergibt sich aus der Standardabweichung $\hat{\sigma}$, der Anzahl der Messungen n und der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit α in Form des Wertes $t_{n-1, \alpha/2}$. Aus den Daten der Stichprobe kann nun auf den wahren Mittelwert μ der Grundgesamtheit mit dem Vertrauensbereich $cnf(\bar{x})$ geschlossen werden. Ein Rechenbeispiel in [62] zeigt, dass trotz einer kleinen Stichprobe ($n > 3$) die Lage des wahren Mittelwertes mit einem schmalen Vertrauensbereich bestimmbar ist.

Wählt man beim t-Test nach Gleichung (34) dieselben Ausgangsparameter wie im Beispiel für den F-Test ($\alpha = 0.1$ und zwei Freiheitsgrade) (Kap. 5.2.1), so erhält man $t = 2.920$. Es ist erkennbar, dass bei der Bewertung von Streuungen mit einem höheren Vertrauensbereich gerechnet wird als bei der Beurteilung von Mittelwerten, da Mittelwerte weniger streuen als die Streuungen aus der selben Stichprobe [62].

Durch den Einsatz von Microsoft Excel sind heute Tabellenwerke zur Bestimmung von t oder $F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$ nicht mehr nötig, da das Programm diese Werte für alle Irrtumswahrscheinlichkeiten berechnet. Dazu werden die Befehle „TINV(α ;n-1)“ oder „FINV(α ;n₁-1,n₂-1)“ verwendet. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei dem von Excel generierten Wert um das Ergebnis für einen zweiseitigen Test handelt. Um die Werte für einen einseitigen Test zu erhalten, müssen die Beträge für α in der Befehlszeile verdoppelt werden.

5.2.3 Varianzkomponenten

Um die wahre Präzision einer Methode zu ermitteln, sind also sehr hohe Datenzahlen notwendig. Um die dadurch entstehenden Kosten und die benötigte lange Messzeit für entsprechende Analysenserien so gering wie möglich zu halten, besteht großes Interesse an Schätzungen der Messunsicherheit. Eine Möglichkeit zur Abschätzung besteht in der Beurteilung der einzelnen Varianzkomponenten [62].

Die Gesamtvarianz einer Analysenmethode besteht aus der Summe der Einzelvarianzen der fehlerbehafteten Größen, gegebenenfalls gewichtet mit den zugehörigen partiellen Ableitungen. Zur Berechnung wird die Gaußsche Fehlerfortpflanzungsrechnung eingesetzt.

Nach dem allgemeinen Fehlerfortpflanzungsgesetz gilt, dass sich die Varianzen der Einzelfehler additiv verhalten. Im einfachsten Fall sind nur zwei voneinander unabhängige Varianzkomponenten vorhanden, und es ergibt sich die Gesamtvarianz $\hat{\sigma}_{ges}^2$ nach (34) aus der Summe der Varianzkomponenten $\hat{\sigma}_1^2$ und $\hat{\sigma}_2^2$.

$$\hat{\sigma}_{ges}^2 = \sum_{i=1}^n \hat{\sigma}_i^2 \quad (34)$$

Standardabweichungen selbst verhalten sich nicht additiv. Durch die Quadrierung der Standardabweichungen erhält man eine zusätzliche Wichtung der Streuung der Einzelkomponenten, denn der prozentuale Anteil starker Streuungen an der Gesamtschwankung wird auf diese Weise erhöht. Ist man an der

Gesamtstandardabweichung einer Methode interessiert, muss daher nach der Addition der Varianzen wieder die Wurzel aus der Summe gezogen werden.

In der Praxis ist eine Bestimmung der Gesamtvarianz komplizierter. Meist sind bei einer analytischen Methode viele Varianzkomponenten zu beachten, wie z.B. die Analysenmessung, die Probenaufarbeitung, die Herstellung des Standards oder die manuellen Fähigkeiten des Analytikers. Die eben beschriebenen Komponenten lassen sich jede für sich weiter aufteilen: bei der Herstellung des Standards kommen z.B. Wäge- oder Verdünnungsvarianzen hinzu. Da es Varianzkomponenten gibt, die nicht unabhängig voneinander sind, müssen zusätzliche Kovarianzterme berücksichtigt werden [62], so dass die Abschätzung der analytischen Unsicherheit nur mit erheblichem Aufwand zu leisten ist. Durch die Verwendung geeigneter Software kann dieser Aufwand teilweise reduziert werden. Meist ist der Beitrag kleinerer Varianzkomponenten wie Wäge- und Volumenfehler leicht abzuschätzen, aber gerade diese spielen nur eine untergeordnete Rolle. Wie bereits erwähnt, verhalten sich Varianzen und nicht Standardabweichungen additiv, so dass sich Fehler mit ihrem Quadrat auswirken. Daher spielen kleine Fehler für den Gesamtfehler nahezu keine Rolle. Die Größe der entscheidenden Varianzkomponenten, z.B. aus der Probennahme, kennt man häufig nicht. Man behilft sich mit Schätzungen und Annahmen, aber die führen zu so vagen Gesamtaussagen, dass man auch direkt den Gesamtfehler schätzen könnte [62].

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen können unter anderem die folgenden Varianzkomponenten auftreten: die Herstellung von Probelösungen und sheath liquid, die Integration und die Ionisierungsprozesse im Interface. Varianzkomponenten der Ionisierung entstehen unter anderem aus dem Schnitt und der Position der Kapillare, den Einstellungen des sheath-flow und dem Einfluss der Konzentration und der Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten auf die Ionisierung.

Um den Anteil einiger dieser Komponenten an der Gesamtvarianz zu untersuchen, wurde versucht, andere Parameter möglichst konstant zu halten. So wurde größtenteils dieselbe Probe vermessen und das gleiche sheath liquid verwendet, um Schwankungen durch die Herstellung zu minimieren. Um eine Beeinflussung der Gesamtvarianz durch individuell optimierte Integration zu vermeiden, wurden

allgemeingültige Integrationsparameter für alle Trennungen einer Messserie angewendet (Kap. 7.1.7).

5.3 Allgemeine Vorteile durch die Verwendung Interner Standards

Die Verwendung Interner Standards (IS) kann die Präzision von Bestimmungen der Peakfläche signifikant erhöhen [22]. Bei der CE-UV ist beispielsweise die Injektion die dominierende Fehlerquelle [65], während die Hauptvarianzursache der CE-MS bei einer stark variierenden Ionenausbeute im ESI-Interface liegt.

Durch die Verwendung eines IS werden sowohl Injektionsfehler, als auch Verdünnungsfehler bei der Probenvorbereitung und Probenaufkonzentrierung durch Lösemittelverdunstung aus dem Probengefäß ausgeglichen [66], so dass bei der CE-UV mittels IS eine *RSD%* der Peakflächen von 0.5% erreicht werden kann [67]. Wird kein EOF-Marker eingesetzt (Kap. 7.2.7.1), ist es ebenfalls möglich zeitliche Variationen zu korrigieren, da Analyt und IS von Schwankungen der Migrationszeit im gleichen Ausmaß betroffen sind.

In der Praxis wird die gleiche, definierte Menge IS zu allen Proben und Referenzstandards addiert, indem man ein definiertes Volumen einer IS-Lösung zusetzt.

Zur Auswertung werden in den Elektropherogrammen die Peakflächen der Probe A und des IS A_i bestimmt. Anstatt die Peakfläche der Probe direkt zur Bestimmung der Probenkonzentration einzusetzen, wird der Quotient aus A und A_i gebildet und als Signal betrachtet. Zur Konzentrationsbestimmung der Probe c_s wird dieses Signal mit dem Peakflächenverhältnis $A_r/A_{i,r}$ und der Konzentration c_r des Referenzstandards in Bezug gesetzt (35).

$$c_s = c_r \cdot \frac{A_s / A_{i,s}}{A_r / A_{i,r}} \quad (35)$$

Die Werte für $A_s/A_{i,s}$ stammen aus dem Elektropherogramm der Probelösung, während der Term $A_r/A_{i,r}$ aus den Ergebnissen der Peakflächenbestimmungen der Referenzstandardelektropherogramme gebildet werden. Die Verhältnisse von $A_s/A_{i,s}$ und $A_r/A_{i,r}$ müssen durch mehrfache Injektion individuell bestimmt und die Mittelwerte in (35) eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurde nur mit dem Peakflächenverhältnis der

Probe $A_s/A_{i,s}$ gearbeitet, da der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Beurteilung des Einflusses verschiedener IS auf die Präzision und nicht auf einer vollständigen Gehaltsbestimmung lag.

Bei IS kommen zusätzlich zu den üblichen Anforderungen an Reagenzien, wie hohe Stabilität im Lösemittel oder Verfügbarkeit in hoher und konstanter Qualität, weitere wünschenswerte Eigenschaften hinzu. Um die Analysenzeit nicht unnötig zu verlängern, sollte der IS eine kürzere Migrationszeit aufweisen als der Analyt. Wenn möglich, sollten IS verwendet werden, deren molekulare Struktur dem des Analyten möglichst ähnlich ist [22]. Dadurch hat er eine ähnliche Mobilität und migriert nahe beim Analyten, so dass Effekte wie Schwankungen des EOF, nicht gaußglockenförmige Peaks durch Wandadsorption oder thermochromes Verhalten, also Änderungen des Absorptionsbereichs der Analyten durch Temperaturschwankungen in der Kapillare, zusätzlich kompensiert werden. Bei alleiniger UV-Detektion darf der IS jedoch mit keiner Komponente der Probe zusammen migrieren, da sonst eine differenzierte Bestimmung unmöglich ist.

Durch die Verwendung eines massenempfindlichen Detektors eröffnet sich die Möglichkeit, isotoopenmarkierte Analoge des Analyten als IS zu verwenden. Während bei der Verwendung strukturverwandter IS zeitlich bedingte Reaktionsveränderungen im Interface variierende Peakflächen durch die zeitversetzte Elution hervorrufen können [68], ist der Einfluss dieser Variable durch die fast gleichzeitige Migration von Analyt und IS bei isotoopenmarkiertem IS stark reduziert. Außerdem ist bei strukturverwandten IS ein Unterschied in der Ionisierbarkeit von Analyt und IS möglich [6, 69]. Bei der Verwendung eines isotoopenmarkierten IS kann davon ausgegangen werden, dass die Ionisierbarkeit, das Ausmaß an „ion suppression“ durch Matrix und das Fragmentierungsmuster sehr ähnlich sind [66].

Sind mehrere Komponenten einer Probe zu quantifizieren, sollte für jeden Analyten ein eigener IS zugesetzt werden [6, 70, 71], da sich selbst in äquimolaren Lösungen die Ionenintensitäten zweier Analyten um Zehnerpotenzen unterscheiden können [40].

Bei einem isotoopenmarkierten IS sollte die Massendifferenz zwischen Analyt- und IS-Molekülen mindestens drei Dalton betragen [66], um eine deutliche Unterscheidung der Isotopomere sicherzustellen.

Zur Strukturaufklärung mit Hilfe von Fragmentierungsreaktionen, muss bei der Auswahl der zu verwendenden Isotope (^2H oder ^{13}C) bedacht werden, dass die Fragmentierungsreaktionen vom Typ $[\text{M}-\text{H}_n]$ („n“ ist die Anzahl der Protonen) beinhalten können. Sollte eine $[\text{M}-^2\text{H}_n]$ Fragmentierung ablaufen, so könnte man nicht mehr zwischen Analyt- und IS-Fragmenten unterscheiden. Für eine solche Anwendung sind daher ^{13}C -Isotopomere die vorzuziehenden IS.

Um korrekte Ergebnisse zu erhalten muss der eingesetzte IS hundertprozentig (isotopen-)rein [66] und in möglichst hoher Konzentration vorliegen [22], solange Auflösung und Peakform nicht beeinträchtigt werden, da auf diese Weise der Fehler durch natürlich vorkommende ^{13}C -Atome [66] und Rauschen minimiert wird. Zu hohe oder schwankende IS-Konzentration sind zu vermeiden, denn Analyt und IS konkurrieren um den Ladungsüberschuss auf der Tropfenoberfläche (Kap 3.1.1.1). Aus diesem Grund sollte auch die Gesamtkonzentration von Analyt und IS unterhalb der Sättigungsgrenze der Elektrosprayionisierung liegen [26].

Wann immer möglich, sollten SIM-Spektren anstelle von Scan-Spektren verwendet werden, um durch ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis und erhöhte Selektivität eine höhere Richtigkeit und Präzision zu erreichen [66].

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass die Verwendung eines IS nicht in allen Fällen die Präzision von Peakflächenbestimmungen erhöht [22, 25]. Die Hauptursachen liegen bei Detektions- und Integrationsfehlern des IS und führen zu einer nachteiligen Fehleraddition.

6 Entwicklung von kapillarelektrophoretischen Methoden zur Quantifizierung

6.1 Verbesserung der Trennleistung und Reproduzierbarkeit in der Kapillarelektrophorese

Zur Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion sind bereits einige sehr ausführliche Arbeiten veröffentlicht worden [22, 25], so dass hier nur kurz auf die wichtigsten Parameter zur Erhöhung von Trennleistung und Reproduzierbarkeit eingegangen werden soll.

Um eine gegenseitige Beeinflussung der Analyten bei der Detektion zu vermeiden, ist bei allen Detektionsmethoden für eine reproduzierbare Quantifizierung eine vollständige Trennung nötig.

Der wichtigste, die Trennung beeinflussende Faktor in der Kapillarelektrophorese ist der Hintergrundelektrolyt (BGE). Viele Autoren sprechen von „Puffer“, da die Elektrolytlösung neben der Sicherstellung der Leitfähigkeit auch diese Funktion erfüllt (Kap. 2.1). Es werden aber auch Elektrolytlösungen eingesetzt, die keine Pufferkapazität β aufweisen. Hier wäre es falsch, von einem Puffer zu sprechen und besser die allgemeine Form „BGE“ zu verwenden. Die Pufferkapazität β kann näherungsweise nach (36) berechnet werden:

$$\beta = 2.3 \cdot \frac{c_A \cdot c_B}{c_A + c_B} \quad (36)$$

Der zu verwendende BGE-pH-Wert hängt in erster Linie von den pK_A -Werten der zu trennenden Substanzen ab. Der pH-Wert sollte in der Nähe der pK_A -Werte der Analyten liegen, um eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen. Die Konzentration der Elektrolyte im BGE beeinflusst die Trennleistung ebenfalls (Kap. 2.2; 2.3.1). Je höher die Konzentration, desto höher ist auch seine Leitfähigkeit. Der Nachteil der Verwendung hoher Konzentrationen besteht in einer verstärkten Wärmeentwicklung während der Trennung. Dieses „Joulesche Erwärmung“ genannte Phänomen erhöht die Konvektion innerhalb der Kapillare und senkt so die Trennleistung durch Verbreiterung der Peaks. Die Erwärmung führt außerdem zu Bläschenbildung durch

Gasaustritte oder lokale Siedephänomene, welche die Detektion und Peakkoherenz beeinflussen.

Weiterhin lassen sich Trennleistung und Selektivität durch den Zusatz organischer Lösemittel oder den kompletten Verzicht auf Wasser im BGE „non aqueous capillary electrophoresis“ (NACE) modifizieren [72-74]. Außerdem können solche Zusätze die Interaktion der Analyten mit der Wand reduzieren und so zur Erhöhung der Präzision beitragen.

Zur Herstellung des BGE sollte ein reproduzierbares Verfahren angewendet und dokumentiert werden [25]. Bei der Wahl der Komponenten ist, wenn möglich, auf eine konstante Qualität zu achten (z.B. Konzentrationsschwankungen bei Ammoniaklösung). Um die Haltbarkeit zu erhöhen, sollten die BGE verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt werden. So kann eine Verkeimung des Puffers hinausgezögert werden.

Ein Austausch des BGE in den Ein- und Auslassgefäßen nach jeder Trennung ist vorteilhaft. Die Gründe dafür sind das Nachlassen der Pufferwirkung durch Hydroxyl- und Hydroniumionen aus der Elektrolyse, die Kontamination des BGE mit Analyt (über die Kapillare) und die Erhöhung der Elektrolytkonzentration durch Verdunstung des Lösemittels aus dem Gefäß. Außerdem wird eine konstante Füllhöhe vor jeder neuen Messung sichergestellt, wodurch die Präzision erhöht wird [25]. Nach der Injektion der Probe ist es ratsam, erneut eine geringe Menge BGE zu injizieren. Dieses Verfahren verhindert eine Verunreinigung des BGE durch an der Außenseite der Kapillare haftende Probelösung. Zusätzlich wird die Diffusion der Probe ins BGE-Gefäß und versehentliches „Herausdrücken“ von Anionen aus der Kapillare unterdrückt. Anionen migrieren beim Anlegen einer positiven Spannung in Richtung Anode, also aus der Kapillaröffnung durch die sie vorher injiziert wurden, da ihre elektrophoretische Mobilität beim Anlegen der Spannung für einen kurzen Moment höher als die Mobilität des sich bildenden EOF ist (Abb. 2.2.2-2). Für die BGE-Nachinjektion muss ein anderes BGE-Gefäß als für die Trennung verwendet werden, um eine konstante und reproduzierbare Füllhöhe vor der Trennung zu garantieren.

Wurden zu lange Injektionszeiten bei der hydrodynamischen Injektion gewählt, um einen möglichst hohen Probenauftrag zu erreichen, kann durch die Länge der in der

Regel schlechter leitenden Probenzone die Trennleistung ebenfalls gemindert werden. Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der Injektion zu gewährleisten, sollte die hydrodynamische Methode bevorzugt werden [22, 25, 26].

Weitere Ursachen für verminderte Trennleistung sind Konvektion und Diffusion der Analyten durch eine zu lang gewählte Kapillare und ein unregelmäßiger Schnitt der Kapillarenden. Bei unregelmäßigen Kapillarenden führt ein inkohärenter EOF zu verzerrten Peakformen und damit zu einer Senkung der Trennleistung [24, 25]. Daher ist eine optische Kontrolle der Enden mit einem Mikroskop oder Verwendung bereits fertig zugeschnittener Kapillaren sinnvoll. Um Übertragungseffekte („sample carry-over“) und Einflüsse der Beschichtung („fransiges“ Ende) auf die Trennung auszuschließen, wird ca. 1 mm der Polyimidschicht an den Kapillarenden entfernt [25]. Wie bereits beschrieben, spielt die Länge der Kapillare für die Effektivität der Auftrennung eine untergeordnete Rolle, so dass Einflüsse von Diffusion und Konvektion durch den Einsatz kürzerer Kapillaren reduziert werden können, wobei gleichzeitig die Analysenzeiten verkürzt werden.

Einflussgröße	Gegenmaßnahmen
Joulesche Erwärmung	Thermostatisierung der Kapillare, ↓ der angelegten Spannung, ↓ der BGE-Ionenstärke, ↑ der BGE-Viskosität, ↑ des Querschnitt-Längenverhältnisses der Kapillare
Diffusion / Konvektion	↑ der angelegten Spannung, ↑ der BGE-Viskosität, ↓ der Temperatur
Adsorptionseffekte	Optimierung von pH-Wert oder Ionenstärke des BGE, dynamische oder permanente Kapillarbeschichtung, Zusatz organischer Lösemittel
Länge der injizierten Probenzone	↓ der Injektionszeit, elektrokinetische Injektion, „stacking“ Verfahren

Tab. 6.1-1: Physikalische Größen, die eine Auswirkung auf die Trennleistung in der CE haben. In der rechten Spalte werden Möglichkeiten zur Beeinflussung dieser Größen aufgezählt. ↑: Erhöhung; ↓: Absenkung

Bei UV-Detektion sollte der BGE nicht im selben Wellenlängenbereich wie der Analyt absorbieren, bzw. eine Detektionswellenlänge gewählt werden, bei der der BGE eine möglichst geringe Eigenabsorption aufweist. Ist dies nicht möglich, bleibt noch die Möglichkeit der indirekten Detektion, bei der im Absorptionsmaximum des BGE gemessen wird.

6.2 Erhöhung der Reproduzierbarkeit in der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

Ähnlich der optischen Detektion (UV- oder Fluoreszenz-Detektion) ist auch bei der Elektrospray-Ionisierung das Ausmaß des Ansprechens eines Analyten auf die Detektionsmethode stark von seiner Molekülstruktur abhängig. Bei optischen Detektionsverfahren hängt die Empfindlichkeit unter anderem von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes, dem pH-Wert, der Größe des delokalisierten π -Elektronensystems und dem Einfluss elektronenziehender oder –schiebender funktioneller Gruppen ab. Im Gegensatz dazu ist bei der ESI die unterschiedliche Ionisationseffizienz unter anderem von der Oberflächenaktivität und vom Säure-Base-Gleichgewicht der Ionen in Lösung und in der Gasphase abhängig. Wie bei der UV-Detektion handelt es sich bei der ESI innerhalb eines weiten Konzentrationsbereichs um einen linearen Prozess.

Obwohl bei der Entwicklung von Methoden zur Quantifizierung mit CE-MS viele Parameter und Verfahrensweisen der CE-UV Methodenentwicklung übernommen werden können, gilt es einige Besonderheiten zu beachten, um durch einen konstanten Ionisationsprozess die Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse zu schaffen. Dabei muss bei Mehrkomponentenanalysen aufgrund der individuellen Ionisierbarkeiten der Analyten in den meisten Fällen ein Kompromiss bei der Wahl der Ionisierungsbedingungen gefunden werden.

6.2.1 Hintergrundelektrolyt

Wie in der CE-UV sollte der BGE die Detektion möglichst wenig beeinflussen. Dieses Ziel ist durch die Wahl leicht flüchtiger BGE-Komponenten erreichbar. In der Praxis werden daher fast ausschließlich BGE, die auf Ammoniumacetat oder -formiat basieren, verwendet. Da es teilweise schwieriger ist mit diesen BGE eine Trennleistung zu erreichen, die nicht-flüchtigem BGE äquivalent ist, wurden auch Trennungen mit nicht-flüchtigen BGE untersucht, bei denen allerdings die Empfindlichkeit durch Ionenunterdrückung erheblich reduziert war [41, 49]. Tenside, wie das in der Proteinanalytik mit CE-UV und der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) häufig verwendete Natriumdodecylsulfat (SDS), sind bei

einer Massenkopplung gänzlich ungeeignet, da sie als stark oberflächenaktive Substanzen ebenfalls zu einer sehr hohen Ionenunterdrückung (Kap. 3.1.1.1) führen. Wie bereits erwähnt, ist der pH-Wert des BGE der wichtigste Parameter bei der Methodenentwicklung [22]. Durch die Limitierung auf flüchtige BGE stehen als Anionen Acetat, Formiat und in geringem Maße Carbonat, als Kationen Ammonium oder (seltener) Methlyammonium zur Verfügung. Mit diesen Komponenten lassen sich pH-Werte von ungefähr 2 bis 12 einstellen (1M Ameisensäure: pH = 1.85; 1M NH₃: pH = 11.8). Um den pH-Wert unter 2 zu senken, besteht die Möglichkeit dem BGE Trifluoressigsäure (TFA) zuzusetzen. In den meisten Fällen führt dieser Zusatz aber zu geringerer Empfindlichkeit [75] oder reduzierter Trennleistung [9].

Bei der Wahl zwischen Acetat oder Formiat als BGE-Komponente sollte die Trennleistung und nicht die Präzision der Peakfläche das Hauptauswahlkriterium sein (Kap. 8). Obwohl die Empfindlichkeit der Methode durch Ionenpaarbildung zwischen Acetat und Analyt oder der etwas schlechteren Flüchtigkeit von Essigsäure (Dampfdruck bei 20 °C: Ameisensäure (98%): 42 hPa; Eisessig: 15.4 hPa) reduziert sein kann, haben diese Aspekte keinen Einfluss auf die Präzision der Methode [76], solange nicht im Bereich der Bestimmungsgrenze gearbeitet wird. Der Zusatz von organischen Lösemitteln oder NACE zur Optimierung der Trennleistung wurde bereits im vorhergehenden Kapitel angedeutet (Kap. 6.1). Obwohl ein Einfluss auf die Signalintensität besteht [46], bleibt die Präzision der Methode annähernd gleich.

Aus der CE-UV ist bekannt, dass durch eine erhöhte Elektrolytkonzentration die Trennleistung verbessert werden kann. Dies gilt auch für die CE-MS. Jedoch muss ein Kompromiss zwischen hoher Trennleistung und guter Ionisierung (Ionenpaarbildung, Ionenunterdrückung) gefunden werden [52].

Stellt sich in Versuchen heraus, dass die Ionisation der Analyten nicht beeinflusst ist, so wird die Konzentration des Elektrolyten hauptsächlich vom Design des Interfaces bestimmt. Bei Interfaces, bei denen durch Erdung des Sprayers die hohen Stromstärken der CE von den niedrigen der ESI getrennt sind, ist es gefahrlos möglich, mit Stromstärken über 50 µA zu arbeiten. In diesem Fall kann die Elektrolytkonzentration so hoch gewählt werden, wie es für eine optimale Trennung der Analyten notwendig ist. Trotzdem ist meist die Stromstärke gerätetechnisch auf 50 µA limitiert, um das Risiko der Peakverbreiterung durch Joulesche Erwärmung zu reduzieren. Ein weiteres, bislang noch nicht vollständig geklärtes Phänomen, ist das

teilweise Auftreten von Kapillarbrüchen im Sprayerinterface bei höheren Stromstärken. Als Ursache vermutet man die langsame, korrosionsartige Zerstörung der Kapillare durch Mikrobrüche. In der Literatur [77, 78] wird diese Beobachtung als „electrodrilling“ bezeichnet.

6.2.2 Sheath liquid

Bei der Kopplung von CE und MS mit einem sheath-flow Interface wird die Ionisierung hauptsächlich von der Zusammensetzung und Flussrate des sheath liquid beeinflusst [45], da die Flussrate des sheath liquid die des BGE aus der Kapillare um ein Vielfaches (10-100fach) übersteigt. Um die beste Ionisationseffizienz und Spraystabilität zu erreichen, sind Parameter wie Konzentration, pH-Wert, Flüchtigkeit, Oberflächenspannung und Flussrate zu optimieren. Bei der Zusammensetzung des sheath liquid ist wie bei der BGE-Wahl ein Kompromiss einzugehen. Einerseits sorgt ein hoher Anteil organischer Lösemittel durch eine niedrigere Oberflächenspannung (im Vergleich zu Wasser) für kleinere Tröpfchen [12, 79] und eine hohe Flüchtigkeit [80] für eine hohe Ionenausbeute (Kap 3.1.1). Andererseits sinkt dadurch die Leitfähigkeit der Lösung und damit die Spraystabilität [10]. Ähnliches gilt für den Anteil an Elektrolyt. Ein hoher Anteil verbessert die Leitfähigkeit, durch Ionenpaarbildung und Ionenunterdrückung kann aber die Empfindlichkeit stark reduziert sein [12, 76, 81].

In den meisten Fällen besteht das sheath liquid aus organischen Lösemittel/Wasser-Mischungen, wobei Isopropanol und Methanol am häufigsten verwendet werden. Isopropanol sollte Methanol vorgezogen werden, da es erstens bei den meisten Analyten zu einer geringfügig höheren Ionenausbeute führt [10, 60, 82] und zweitens aufgrund des Herstellungsprozesses weniger Verunreinigungen enthält. Ein weiteres Lösemittel, das zur Herstellung des sheath liquid eingesetzt wird, ist Acetonitril. In den meisten Berichten resultiert mit Acetonitril im Vergleich mit den eben genannten Alkoholen eine geringere Ionenausbeute [10, 82]. Allgemeingültige Aussagen über die „Ionisierungsqualität“ von sheath liquid-Zusätzen sind schwer zu treffen, da die Ionisierbarkeit des Analyten hauptsächlich von dessen funktionellen Gruppen abhängt. In Publikationen werden daher für unterschiedliche Analyten verschiedenste Zusammensetzungen des sheath liquid beschrieben (Tab. 8-1 – 8-3).

Durch den Zusatz flüchtiger Elektrolyte zum sheath liquid lassen sich sowohl die Stromstärke der CE (sheath liquid als Ersatz für das Auslass-BGE-Gefäß) als auch die Stromstärke des Sprays (verbesserte Leitfähigkeit) stabilisieren. Dadurch resultiert eine höhere und stabilere Ionenausbeute. Allerdings ist in Abhängigkeit vom Analyten bei zu hoher Konzentration der Elektrolyte (teilweise schon ab 1%) durch Ionenpaarbildung oder Ionenunterdrückung eine Signalreduzierung möglich [12, 83].

Im positiven Ionenmodus werden Ameisen- oder Essigsäure eingesetzt, wobei einige Autoren über Ionenpaarbildung von Essigsäure mit dem Analyten berichtet haben [59, 84]. Arbeitet man im negativen Ionenmodus, kann Ammoniaklösung als Elektrolyt eingesetzt werden. Die zur Herstellung von BGE und sheath liquid eingesetzten Komponenten sollten gleichartig sein, da in Abhängigkeit der Stärke des EOF Elektrolytionen aus dem sheath liquid in die Kapillare gelangen und dort die Trennbedingungen verändern können. In [10, 85] wird in diesem Fall vom Entstehen einer sich bewegenden pH-Grenzfläche („moving pH-boundary“) gesprochen und eine Angleichung der Elektrolyten in sheath liquid und BGE empfohlen. Der pH-Wert des sheath liquid scheint laut [10, 12, 86] einen geringen Einfluss auf die Signalintensität zu haben, wobei die unterschiedlichen Basizitäten der Analyten in flüssiger und gasförmiger Phase als Ursache für diese Beobachtung vermutet werden.

Grundsätzlich sollten Lösemittel und Elektrolytkomponenten einen möglichst hohen Reinheitsgrad aufweisen, um eine Adduktbildung zu reduzieren (Kap. 3.1.1). So können beispielsweise Natriumaddukte eines Analyten eine andere Ionisierungseffizienz als ihr protoniertes Analogon aufweisen. In diesem Fall müssten die Peaks beider m/z-Verhältnisse ($[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$) zur Quantifizierung addiert werden, wobei dann immer noch nicht bekannt ist, ob die Ionisierungseffizienz gleich war. Die Adduktbildung wirkt sich bei der Prüfung auf Linearität, besonders bei geringen Analytkonzentrationen, negativ aus. Die adduktbildenden Teilchen sind nur in einer begrenzten Menge vorhanden, was bei steigender Analytkonzentration zu einer konstanten Menge von $[M+Na]^+$ führt, während die Menge an $[M+H]^+$ stetig zunimmt. Das bedeutet, dass bei geringen Analytkonzentrationen die Addukte einen überproportionalen Einfluss haben, was zu einer Nichtlinearität in diesem Bereich führt.

Die Flussrate des sheath-flow sollte weder zu niedrig, noch zu hoch gewählt werden. Ist sie zu niedrig, kann das Spray instabil werden, und es kann zu einer Verbreiterung der Peaks kommen [10]. Bei einer zu hohen Flussrate sinkt das Signal-Rausch-Verhältnis [50], und es besteht die Gefahr einer Verringerung der Auflösung [10] durch den Sog des sheath-flow. In der Literatur werden in der Regel Flussraten zwischen 2 – 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ beschrieben. Um das Rauschen zu minimieren, sollte das sheath liquid mit einer HPLC-Pumpe, deren Flussrate mit einem Splitter reduziert wurde, anstelle einer Spritze injiziert werden [49].

Die Höhe der Flussrate des nebulizer gas beeinflusst die Migrationszeit und die Auflösung [12, 87]. Dieser Parameter sollte daher nicht zu hoch eingestellt werden, da der in der Kapillare entstehende Sog die Trennleistung senkt [9, 12]. Bei hydrodynamischer Injektion kann der Sog die Injektionsvolumina beeinflussen, so dass immer mit oder immer ohne eingeschaltetem nebulizer gas injiziert werden sollte [8].

In [50] wird empfohlen nur bei ausgeschalteter Ionenquelle zu injizieren, da die Präzision der Injektion durch das nebulizer gas und das Vakuum im Massenspektrometer vermindert werden kann.

Die Flussrate des nebulizer gas darf aber auch nicht zu niedrig gewählt werden, da es zur Vernebelung der Flüssigkeit aus dem Interface und somit zur Spraybildung beiträgt. Es entstehen kleinere Tröpfchen und die Verdunstung ist beschleunigt, so dass das Rauschen reduziert wird [49] und eine höhere Empfindlichkeit resultieren kann [12, 87].

6.2.3 Kapillare und weitere Parameter

Durch die Verwendung von Kapillaren mit einem geringeren Innendurchmesser ($< 50 \mu\text{m}$) kann die Empfindlichkeit der Methode und damit die Präzision erhöht werden [55, 56], da die Flussrate aus der Kapillare sinkt.

Neben einem gleichmäßigen Kapillarschnitt [46, 50, 60], der für ein stabiles und reproduzierbares Spray notwendig ist, spielt die reproduzierbare Positionierung der Kapillare im Interface eine bedeutende Rolle (Abb. 6.2.3-1) [56]. Ohne definiertes

Kapillarpositionierungsverfahren ist diese Voraussetzung, beispielsweise beim Wechseln der Kapillare, in der Praxis nur sehr schwer zu erreichen [46, 60].

Wird in Veröffentlichungen ein Kapillarpositionierungsverfahren beschrieben, handelt es sich bei den meisten Arbeiten um einen definierten Abstand zwischen Kapillarspitze und der Spitze des Stahlrohrs, in der die Kapillare steckt [83] oder der Kapillare und dem Eingang vom Massenspektrometer [26]. Grundsätzlich sollte versucht werden, den Abstand zwischen Kapillarspitze und Interface möglichst klein zu halten, um eine gleichmäßige Durchmischung von BGE beziehungsweise Analyt und sheath liquid zu ermöglichen [55, 56, 76]. In [88] wird ein Positionierungsverfahren beschrieben, bei dem sich an einem konstanten Spraystrom unter gleichzeitigem Beibehalten der Trennleistung orientiert wird. Einen anderen Ansatz verfolgen die Autoren von [59], die einen Totalionenstrom von mindestens 10^4 Zählimpulsen (counts) und einen Spraystrom unter $10\text{ }\mu\text{A}$ zur Kapillarpositionierung verwenden. Bei einem weiteren in dieser Arbeit vorgestellten Positionierungsverfahren wird das Analytsignal auf eine vorher definierte Intensität eingestellt (Kap. 7.1.6; 11.7.2).

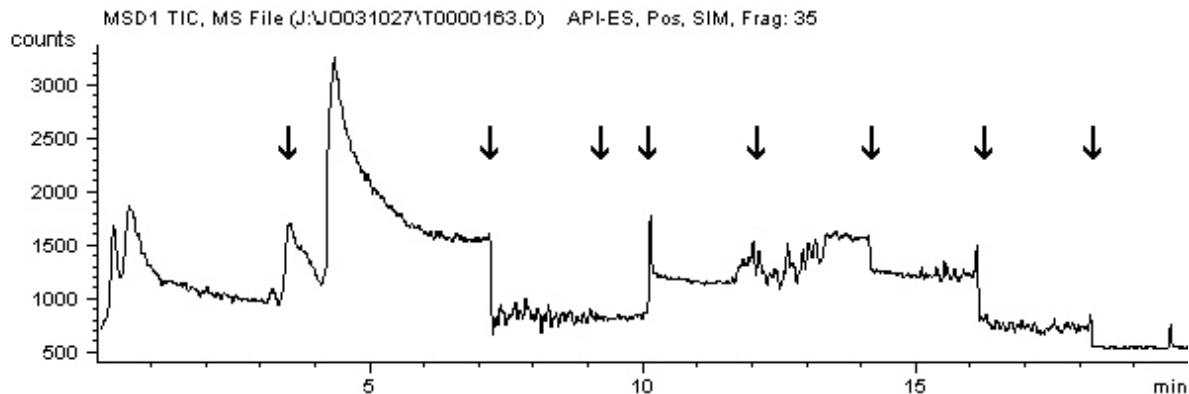


Abb. 6.2.3-1: Abhängigkeit der Signalintensität von der Kapillarposition. Nach der Injektion von BGE wird das Online-Signal des Neostigminübertrags beobachtet. Während der Trennung wurde die Position der Kapillare im Interface verändert (Pfeile). Das hohe Signal nach ca. 4 min stammt wahrscheinlich von einem Tropfen, der sich durch das Verschieben der Kapillare gebildet und anschließend gelöst hat.

Beim Aufstellen eines CE-MS-Systems ist darauf zu achten, dass die im Massenspektrometer endende Öffnung der Kapillare nicht tiefer als das andere Ende liegt, um einen Siphoneffekt zu vermeiden [10, 50].

Weitere Parameter, wie beispielsweise die Position des kompletten Interface relativ vor der Öffnung des Massenspektrometers (nicht bei Nanosprayinterfaces), die

Flussrate und die Temperatur des Trocknungsgases und das ESI-Potential haben einen geringeren Einfluss auf Stabilität und Empfindlichkeit [12, 87-89]. In [87] wird der Einfluss der Temperatur des Trocknungsgases auf die Signalintensität beschrieben. Eine höhere Temperatur verbessert die Verdunstung und führt zu höheren Signalen. Dieser Effekt ist im Bereich vom 30 – 100 °C besonders ausgeprägt. Oberhalb von 100 °C ist der Einfluss dieses Parameters von geringerer Bedeutung. Daher kann bei der Methodenentwicklung von Anfang an mit einer höheren Temperatur gearbeitet werden, solange die Analyten thermostabil sind. Wurden diese Parameter einmal eingestellt, brauchen sie bei der Entwicklung neuer Methoden nicht verändert zu werden, es sei denn, thermisch instabile Substanzen sollen untersucht werden.

Bei der Quantifizierung trägt die Bauart des Analysators und seine Einstellungen nur einen geringen Teil zur Präzision der Methode bei (Tab.8-1 - 8-3) [76], so dass die Optimierung des Detektors hier nicht weiter beschrieben wird. Allerdings kann das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) durch die Wahl des Betriebsmodus erhöht werden. Im SIM-Modus werden ausschließlich die Masse-Ladungs-Verhältnisse der Analyten detektiert und das chemische Rauschen z.B. vom BGE ausgeblendet. Wurden im SIM-Modus mehrere Analyten gleichzeitig detektiert, enthält das TIE immer noch das Rauschen aller Analyten. Durch die rechnerische Reduktion auf ein einziges m/z-Verhältnis, kann im EIE das Rauschen weiter reduziert werden [90].

Beim Methodentransfer einer CE-UV-Methode auf eine CE-MS-Methode ist der Wechsel von einem nicht flüchtigen zu einem flüchtigen BGE der schwierigste Schritt, da die erreichte Trennleistung möglichst beibehalten werden sollte. Auch wenn bereits bei der Methodenentwicklung auf einem CE-UV-Gerät mit flüchtigen Puffern gearbeitet wurde, kann beim Wechsel auf ein CE-MS-Instrument unter anderem durch den Sog von sheath-flow und nebulizer gas, sowie den veränderten Druckverhältnissen in der Kapillare und dem Fehlen eines Auslassgefäßes eine Neuoptimierung notwendig werden. Daher sollten Methoden für CE-MS von Beginn an auf geeigneten Instrumenten entwickelt werden.

6.2.4 Quantitative Aspekte bei der Datenauswertung

Soll die Gerätepräzision bestimmt werden, so ist die Verwendung einer hohen Probenkonzentration und langen Injektionszeiten ratsam, denn auf diese Weise resultiert ein hohes S/N [46]. Das erhöhte S/N wirkt sich positiv auf die erreichbare Präzision aus, da der Anteil des Integrationsfehlers am Gesamtfehler sinkt [91]. Aus diesem Grund sollte bereits bei der Methodenentwicklung auf ein möglichst hohes S/N hingearbeitet werden, wie in [12] demonstriert.

Bei der Auswertung von Elektropherogrammen, die mit UV-Detektion aufgenommen wurden, ist es üblich mit normalisierten Peakflächen zu arbeiten. Dazu wird der Quotient aus der gemessenen Peakfläche und der Migrationszeit des Peaks gebildet. Die Ursache für diesen Rechenschritt ist die Detektion durch ein Detektionsfenster. Analyten mit einer niedrigen Gesamtmobilität migrieren langsamer durch das Fenster als Analyten mit hoher Mobilität. Daher verweilen sie auch länger im Strahlengang, was selbst bei gleicher Konzentration und gleichem molaren Absorptionskoeffizienten insgesamt zu einem größeren Signal führt [92]. Durch die Quotientenbildung wird dieser Zuwachs ausgeglichen. Wird zur Detektion ein Massenspektrometer verwendet, kann diese Rechenoperation entfallen, da bei langsamerer Elution der Substanzen die Peaks zwar breiter und flacher werden, die Peakfläche aber konstant bleibt.

Zur Quantifizierung mit MS sollte wie bei der CE-UV die Peakfläche und nicht die Peakhöhe herangezogen werden, da erstere geringeren Variationen unterliegt und der lineare Bereich größer ist [25].

6.2.5 Schema zur Methodenentwicklung für quantitative Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

- I. Definition der Anforderungen an die Methode; z.B. die zu erreichende Präzision, Angabe der zu quantifizierenden Komponenten (Hauptkomponente, Verunreinigungen oder Spurenanalytik)

- II. Optimierung des pH-Wertes und der Ionenstärke des BGE auf ausreichende Trennleistung unter Berücksichtigung bereits veröffentlichter Ergebnisse (falls vorhanden). Als BGE-Komponenten sollten Ammoniumacetat, -formiat oder -carbonat eingesetzt werden. Das sheath liquid sollte zu Beginn der Methodenentwicklung aus einer 1:1 Mischung Wasser/Isopropanol bestehen und eine Flussrate von 5 µL/min aufweisen.
- III. Sollte mit fused-silica Kapillaren keine ausreichende Trennung erreicht werden, besteht die Möglichkeit beschichtete Kapillaren zu verwenden.
- IV. Modifikation des BGE zur Verbesserung der Empfindlichkeit, ohne die Trennleistung zu stark zu reduzieren (z.B. Zusatz eines organischen Lösemittels).
- V. Optimierung der sheath liquid Zusammensetzung (durch den Zusatz einer Säure im positiven und Ammoniaklösung im negativen Detektionsmodus) und der Flussrate auf Empfindlichkeit und Spraystabilität. Die Zusätze sollten auf die BGE-Komponenten abgestimmt sein.
- VI. Anwendung eines Kapillarpositionierungsverfahrens, basierend auf der Intensität eines Referenzsignals und/oder Spraystroms unter Beibehaltung der Trennleistung. Ist das Kapillarpositionierungsverfahren unabhängig von der Trennung der zu entwickelnden Methode, wird z.B. ausschließlich der Spraystrom verwendet, kann dieser Schritt auch an Position I. stehen.
- VII. Zur weiteren Empfindlichkeitsverbesserung ist der Einsatz von on- oder off-line-Aufkonzentrierungsverfahren möglich.
- VIII. Verwendung eines (isotopenmarkierten) Internen Standards. Alternativ ist die Nachinjektion des zu bestimmenden Analyten möglich.
- IX. Soll die Empfindlichkeit weiter erhöht werden, ist ein Methodentransfer auf ein sheathless Interface möglich. Voraussetzungen: starker EOF, Entwicklungszeit, Erfahrung.

7 Untersuchungen zur Präzision und Ionisierungsausbeute an einem kommerziell erhältlichen Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie-System

7.1 Vorversuche / Vorüberlegungen

7.1.1 Entwicklung der Proben

Um eine Vergleichbarkeit zu bereits bestehenden Ergebnissen zu gewährleisten und gleichzeitig eine valide Basismethode zu haben, basiert die Zusammensetzung von Probe I auf einer Methode, die zum Vergleich der Präzision verschiedener CE-Systeme entwickelt wurde [93, 94]. Die dort verwendete Probe bestand aus Acetylsalicylsäure, Paracetamol, Dihydroxybenzoesäure und Nikotinsäure. Acetylsalicylsäure ist in wässriger Lösung instabil, so dass die Probelösungen nach längerer Lagerung nicht mehr verwendbar waren. Daher wurde diese Substanz im Folgenden nicht weiter verwendet. Nach der Umstellung auf flüchtige BGE konnte die Basislinientrennung von Nikotin- und Dihydroxybenzoesäure nicht aufrechterhalten werden, so dass eine von beiden Substanzen entfernt werden musste. Nach Untersuchungen zur Ionisierbarkeit durch direkte Injektion in ein Massenspektrometer wurde die Dihydroxybenzoesäure aufgrund ihrer schlechteren Ionisierbarkeit als Probenkomponente gestrichen.

Als Ersatz wurde Neostigminbromid angedacht. Im Kommentar der zehnten Ausgabe des Deutschen Arzneibuchs wird auf eine Hydrolyseempfindlichkeit der Substanz in wässriger Lösung bei Raumtemperatur hingewiesen [95]. Eine solche Instabilität wäre ein Ausschlusskriterium für diese Substanz gewesen, so dass eine wässrige Neostigminlösung mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend elektrophoretisch getrennt wurde. Beim Vergleich mit dem Elektropherogramm einer Trennung vor dem Erhitzen, hatte weder die absolute Peakfläche abgenommen, noch waren neue Peaks von Hydrolyseprodukten hinzugekommen. Auf der Basis dieses Versuchs wurde davon ausgegangen, dass das Molekül in wässriger Lösung stabil ist.

Durch das quartäre Stickstoffatom ist es permanent positiv geladen, so dass es vor den anderen Analyten, anstatt wie die Dihydroxybenzoesäure zusammen mit der

Nikotinsäure migriert. Außerdem ist Neostigmin leicht als Ion in die Gasphase zu überführen und massenspektrometrisch zu detektieren. Das bedeutet, die fertige Probe I besteht aus einem Kation (leicht ionisierbar), einer neutralen Substanz (Paracetamol), die auch als EOF-Marker dient, und einem Anion (deprotonierte Nikotinsäure), welche bei der Überführung in die Gasphase erst ihre Polarität wechseln muss. Mit dieser Kombination war es möglich, die Ionisationsreproduzierbarkeit von Substanzen unterschiedlicher Ladungszustände zu beurteilen. Da die drei Analyten weit voneinander entfernt migrieren, war eine gegenseitige Beeinflussung durch Ionenunterdrückung ausgeschlossen, so dass diese Ursache für Variationen ausgeschlossen werden konnte.

Im Verlauf der CE-MS Untersuchungen stellte sich heraus, dass die vergleichsweise schlechte Ionisierbarkeit der Nikotinsäure zu einer sehr niedrigen Präzision führt. Daher wurden Versuche unternommen, diesen Analyten zu ersetzen, wobei die Eigenschaft als Anion in Lösung vorzuliegen erhalten bleiben sollte. Als Alternative wurden folgende Substanzen untersucht: 3, 4-Diaminobenzoessäure, 2, 4, 6-Triamino-Triazin und Probenecid. In Abb. 7.1-1 sind die Signalintensitäten im Vergleich zur Nikotinsäure bei direkter Injektion in das Massenspektrometer abgebildet.

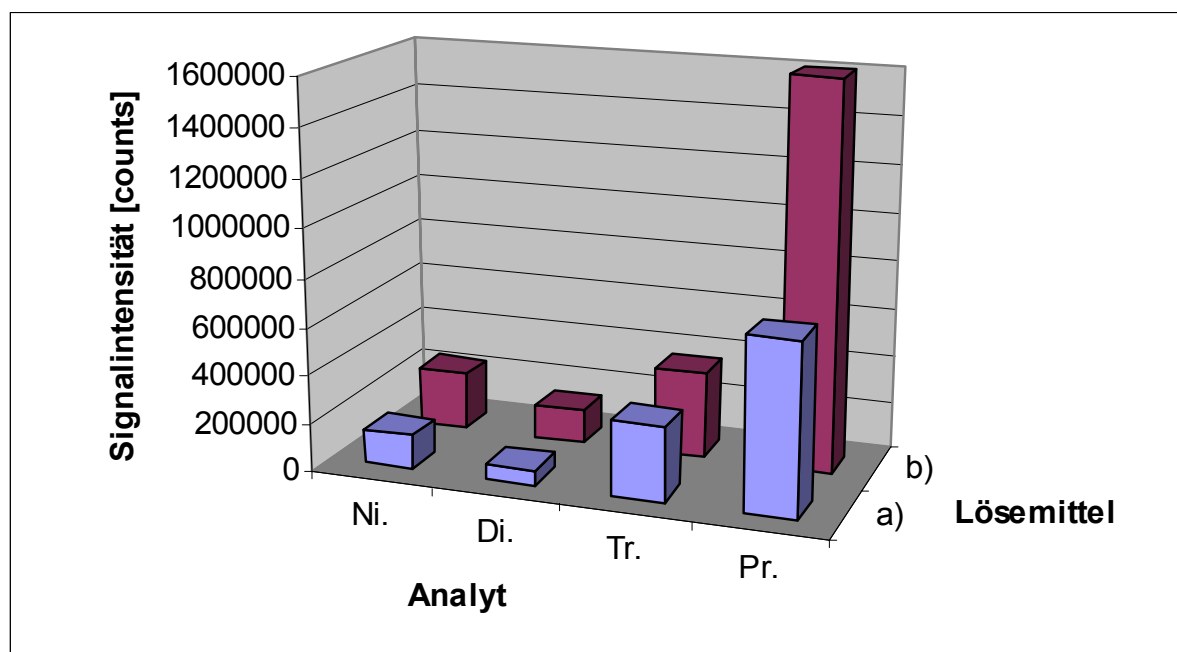


Abb. 7.1-1: Ionenintensitäten von äquimolaren Mengen Nikotinsäure (Ni.); 3, 4-Diaminobenzoesäure (Di.); 2, 4, 6-Triamino-Triazin (Tr.) und Probenecid (Pr.) in 120 mM Ammoniumacetatlösung pH 8.5. Lösemittel: a) Wasser oder b) Wasser/Isopropanol 50:50 (v/v)

Probenecid ist von allen untersuchten Substanzen am leichtesten zu ionisieren. Da diese Substanz sehr schwer wasserlöslich ist und damit höhere Konzentrationen nicht zugänglich sind, wurde von dieser Alternative Abstand genommen und Nikotinsäure als Beispiel für einen in Lösung negativ und in der Gasphase positiv geladenen Analyten beibehalten, da 3, 4-Diaminobenzoesäure noch schlechter ionisierbar war.

Probe II zur Untersuchung von isotoopenmarkierten IS sollte, um eine Vergleichbarkeit zur Probe I sicherzustellen, eine der Substanzen aus Probe I enthalten. Da Paracetamol als einzige Substanz problemlos isotoopenmarkiert verfügbar war, wurde d₄-Paracetamol als IS für Paracetamol ausgewählt.

Die Gründe und theoretischen Überlegungen zur Entwicklung der Proben III – V werden in den Kapiteln 7.4.1 und 7.5.1 beschrieben.

Es wurden Überlegungen angestellt, ob die einzelnen Komponenten der Proben äquimolar, mit gleichen Massenanteilen oder in Konzentrationen, die zu annähernd gleichen Peakflächen führen, einzusetzen seien. Um vergleichbare Aussagen über

die Ionisierbarkeit machen zu können, wurde eine äquimolare Konzentration gewählt, denn auf diese Weise liegt die Menge an Analytmolekülen in den Tröpfchen des ESI-Sprays in vergleichbaren Dimensionen. Die unterschiedlichen resultierenden Peakflächen zeigen dann direkt die individuelle Ionisierbarkeit der Substanz im Vergleich zu den anderen Analyten.

Im Verlauf der Vorversuche zeigte sich, dass die Qualität der BGE trotz Aufbewahrung im Kühlschrank abnahm. Der Qualitätsverlust manifestierte sich in einer Zunahme des Rauschens bei UV-Detektion und im Nachlassen der Trennleistung. Als Ursache wurde eine Verkeimung der Lösung angenommen.

Weiterhin ist bekannt, dass Alkaliionen aus den Wänden der Gefäße in die Flüssigkeit migrieren können. Um das Ausmaß dieser Kontaminationsquelle abzuschätzen wurde der BGE nach der Herstellung mit der Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS) vermessen. Nach sechswöchiger Aufbewahrung in neuen PET-Flaschen, welche weniger Natriumionen abgeben als Glasgefäße und daher besser für die Aufbewahrung geeignet sind, wurde der BGE erneut vermessen, wobei sich die Konzentration an Natriumionen im BGE nicht verändert hatte.

In diesem Zusammenhang wird in [10] auf eine begrenzte Haltbarkeit des BGE hingewiesen, da nach dreiwöchiger Aufbewahrung der BGE vermehrt Kaliumcluster in den Massenspektren auftraten. Um diese Fehlerquellen auszuschließen, wurden die BGE vor ihrer Verwendung frisch hergestellt.

Die Proben und das sheath liquid wurden nur einmal hergestellt, da aufgrund des hohen Isopropanolanteils die Verkeimung des sheath liquid unwahrscheinlich war. Die Gefahr von Störungen durch Alkaliionen schien ebenfalls gering, da die Ergebnisse der AAS-Versuche auf eine geringe Migration von Alkaliionen aus der Gefäßwand schließen ließen und mögliche Addukte bei der Passage des Fragmentors (7.1.5) zerstört wurden.

7.1.2 Entwicklung der Hintergrundelektrolyten

Der pH-Wert des BGE hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Mobilitäten des EOF und der Analyten, so dass eine sorgfältige und reproduzierbare Herstellung unverzichtbar ist [25].

Eine Möglichkeit zur Herstellung besteht darin den Elektrolyten in der Menge einzuwiegen, dass die gewünschte Molarität erreicht wird. Anschließend wird der pH-Wert mit einer Säure oder einer Base eingestellt. Der pH-Wert wird am Besten mit einem pH-Meter überprüft, nachdem durch die Bestimmung von zwei definierten pH-Werten die Steilheit der Kalibriergerade von (mV/ Δ pH) ermittelt wurde. Die Kalibrierstandards müssen dabei so gewählt werden, dass der pH-Wert des einzustellenden BGE zwischen den pH-Werten der Standards liegt.

Ein alternatives Verfahren ist die Herstellung des BGE aus eingewogenen Komponenten, wobei sich der pH-Wert aus der Einwaage ergibt.

Dazu wird die notwendige Einwaage für den gewünschten pH-Wert mit Hilfe der Hendersson-Hasselbalch-Gleichung (37) berechnet.

$$pH = pk_A + \log \frac{c_B}{c_A} \quad (37)$$

Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in der hohen Reproduzierbarkeit von Einwaagen und der Temperaturunabhängigkeit. Grundsätzlich sollte bedacht werden, dass sich bei höher konzentrierten Elektrolyten die Konzentration und die Aktivität der Ionen in Lösung unterscheiden, so dass durch die Verwendung von (37) bei höher konzentrierten BGE immer ein Fehler bei der Berechnung der Einwaagen gemacht wird. Eine Kontrolle des pH-Wertes bei einem auf diese Weise hergestellten BGE ist daher sinnvoll. Um fehlerfrei zu arbeiten, muss der Gehalt der Komponenten angegeben sein und besonders bei hygroskopischen oder oxidationsempfindlichen Substanzen ist auf eine gleich bleibende Qualität und Zusammensetzung zu achten. Im Internet findet sich unter [96] eine sehr gute Quelle zur Berechnung von Einwaagen für den BGE.

Bei der Kopplung von CE und MS sind flüchtige Elektrolyte, wie z.B. Ammoniumacetat oder -formiat eindeutig zu bevorzugen. Diese Systeme basieren auf einer schwachen Säure und einer schwachen Base. Die Anwendung der Hendersson-Hasselbalch-Gleichung ist für solche Säure-Base-Paare nicht möglich, da sie das Gleichgewicht einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base beschreibt. Daher können die Einwaagen beider Komponenten nicht korrekt berechnet werden. Außerdem ist die reproduzierbare Einwaage von flüchtigen Flüssigkeiten, wie Ameisensäure, Essigsäure und Ammoniaklösung schwierig.

Während sich reine Ameisen- und Essigsäure (100%) noch über das Volumen abmessen ließen, kommt bei der Ammoniaklösung noch die Unsicherheit des Gehaltes dazu, da dieser bei jedem Öffnen des Gefäßes abnimmt. Eine genaue Einwaage von kristallinem Ammoniumacetat oder -formiat ist wegen der Hygroskopie beider Substanzen ebenfalls schwierig.

Um die Haltbarkeit der Reagenzien, BGE und Proben zu erhöhen, wurden die Gefäße grundsätzlich im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde die Temperatur von BGE und Probelösungen auf Raumtemperatur erhöht, damit das injizierte Volumen konstant blieb.

Die Versuche zur Entwicklung des BGE erfolgten auf einem Spectraphoresis 1000 CE-Gerät ohne Kopplung mit einem Massenspektrometer.

Die Ausgangsmethode basiert auf einem BGE, der 100 mM Borsäure enthält und mit Natriumhydroxidlösung auf pH 8.5 eingestellt wird. Der ESI-kompatible BGE sollte ebenfalls pH 8.5 aufweisen und um eine Adduktbildung bei der Ionisierung möglichst gering zu halten, keine Natrium- oder Kaliumionen enthalten. Daher beruhten die zu testenden BGE auf Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat; zur Einstellung des pH-Werts wurde Ammoniaklösung verwendet. Die Ionenstärke dieser BGE unterscheidet sich bei demselben pH-Wert und derselben Konzentration vom ursprünglichen BGE, so dass auch eine andere Trennleistung resultiert. Da der pH-Wert 8.5 übernommen werden sollte, musste die Konzentration der Elektrolyten zur Optimierung der Trennleistung variiert werden. Es wurden Elektrolytkonzentrationen von jeweils 10, 30, 60 und 120 mM untersucht, wobei die beste Trennleistung und der stabilste EOF mit 120 mM Ammoniumacetat im BGE erreicht wurde. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Trennleistung mit dem flüchtigen BGE immer niedriger als mit dem ursprünglichen Boratpuffer war.

In späteren Versuchen mit Massenkopplung stellte sich heraus, dass es bei einer so hohen Konzentration des BGE sehr häufig zu einem Zusammenbrechen des Trennstroms kam (Abb. 7.1-2). Danach war es nicht möglich, die Kapillare weiter zu verwenden. Eine Form des „electrodrilling“ (Kap. 6.2.1) kann als Ursache angenommen werden. Eine Wiederholung der Versuche mit einer neuen Kapillare zeigte, dass das Peakmuster aus Abbildung 7.1-2 (unten) nicht reproduzierbar ist,

obwohl das Phänomen erneut auftrat. Mit dem Absenken der BGE-Konzentration auf 10 mM trat dieses Phänomen nicht weiter auf. Bedingt durch die große Differenz der Migrationszeiten wirkte sich die daraus resultierende Verminderung der Trennleistung nicht negativ auf die Präzision aus, da die Peaks immer noch vollständig aufgetrennt wurden. Das Problem des instabilen Trennstroms wurde in [82] erwähnt und ebenfalls durch Konzentrationssenkung des Elektrolyten im BGE bei der Umstellung von UV- auf MS-Detektion gelöst.

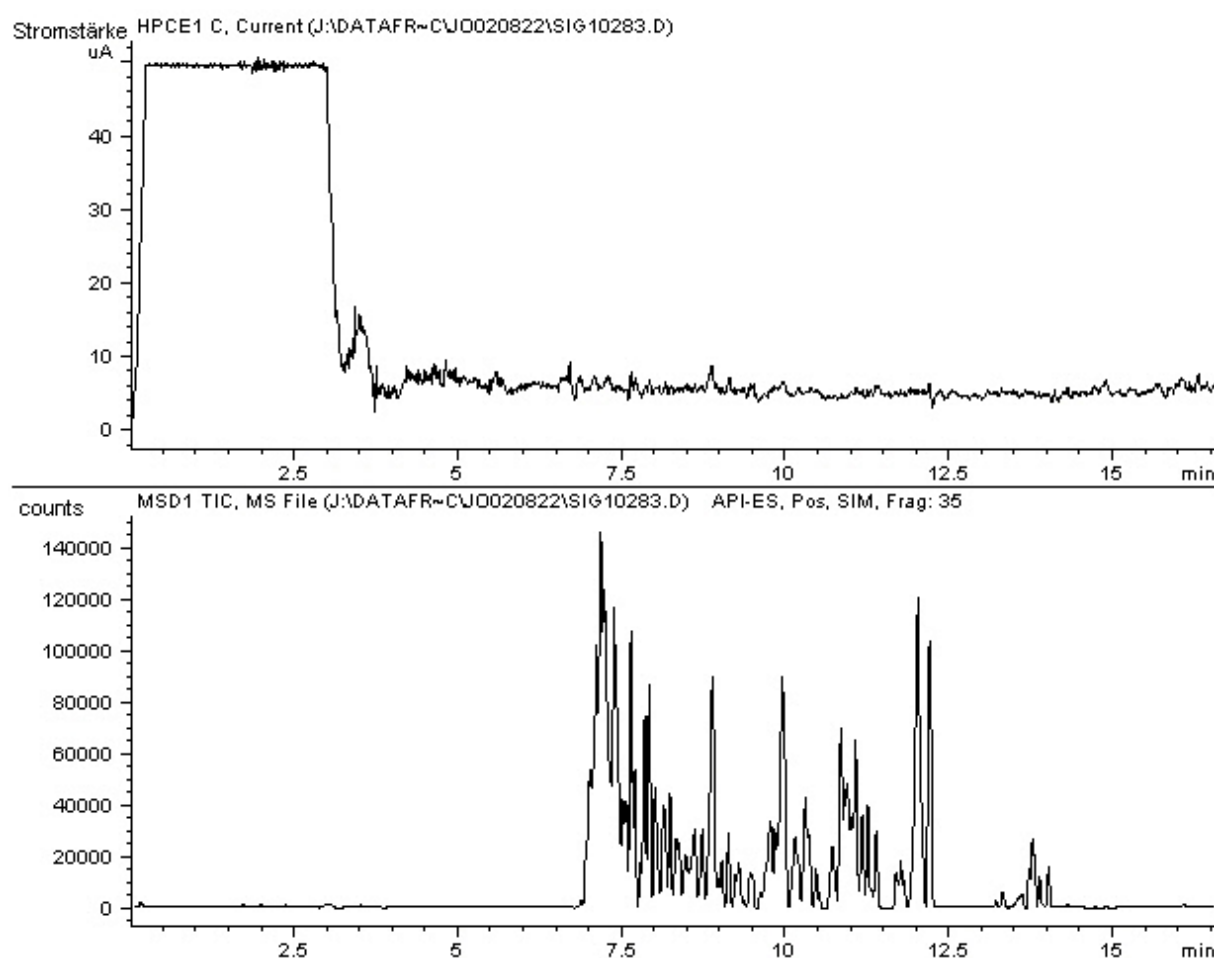


Abb. 7.1-2: Nach drei Minuten sinkt die Stromstärke von 50 μ A auf 5 μ A ab. Eine Trennung der Bestandteile von Probe I ist nicht mehr möglich. Die EIE der einzelnen Analyten zeigten ebenfalls stark aufgespaltene Substanzpeaks. BGE: pH 8.5, 120 mM Ammoniumacetat

Um den Einfluss des BGE-pH-Werts auf die Präzision der Ionisation zu beurteilen, wurde zusätzlich ein BGE mit einem anderen pH-Wert untersucht. Die Überlegung, die zu diesem Schritt führte, war folgende: ein hoher EOF könnte möglicherweise das Elektrospray stabilisieren und so die Präzision erhöhen. Von pH 8.5 ausgehend konnte der pH nicht erhöht werden, weil andernfalls Paracetamol in der Lösung nicht

mehr neutral gewesen wäre. Daher wurde eine Absenkung des pH-Wertes auf 4.0 vorgenommen. Dieser pH-Wert bietet mehrere Vorteile. Zum einen ist er problemlos mit Essigsäure erreichbar. Zum zweiten ist er noch hoch genug, um einige Silanolgruppen zu deprotonieren und einen stabilen EOF zu erhalten. Außerdem ist der Pyridinstickstoff der Nikotinsäure in diesem pH-Bereich noch nicht protoniert, so dass das Molekül weiterhin als Anion in Lösung vorliegt und die Eigenschaften der Probenzusammensetzung erhalten bleiben.

Der Zusatz von organischen Lösemitteln zum BGE sollte zu einer Senkung der Oberflächenspannung der Tröpfchen und damit zu einer verbesserten Verdunstung führen (Kap. 3.11; 6.2.2). Diese Flüssigkeiten reduzieren die Oberflächenspannung des Wassers, indem seine Tendenz zur Clusterbildung durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Wasser- und Lösemittelmolekülen herabgesetzt wird (Hydrotropieeffekt) [97]. Da sich organische Lösemittel also nicht wie Tenside an der Oberfläche der Tröpfchen anreichern, führt ihre Zugabe nicht zur Ionenunterdrückung.

In den Vorversuchen wurde die Zugabe von Methanol oder Isopropanol untersucht, wobei die Migrationszeiten bei vergleichbarer Signalintensität mit Isopropanol stabiler waren. Diese Tatsache und die Verwendung von Isopropanol im sheath-flow führten zur Auswahl der Zugabe von Isopropanol zum BGE. Der Anteil von Isopropanol am BGE wurde auf 10% limitiert, da sich sonst die Analysenzeiten extrem verlängert hätten und durch die geringe Konzentration die Verdunstung von Isopropanol aus dem BGE-Gefäß während der Trennung verringert wurde [98].

Um die im Vergleich zu nicht flüchtigem BGE niedrigere Trennleistung zu erhöhen, wurden außerdem Versuche mit BGE aus Essigsäure und Methylamin unternommen, die keine Verbesserung der Trennleistung brachten.

7.1.3 Konditionierung und Äquilibration der Kapillaren

Es ist wünschenswert bei der Konditionierung der Kapillare auf Natriumhydroxidlösung zu verzichten, da einerseits die Konzentration an Natriumionen, wegen der Adduktbildung möglichst gering gehalten werden sollte, andererseits ausfallendes Natriumhydroxid die Ionenquelle verschmutzt. Daher wurden in Vorversuchen ohne Massenkopplung die Auswirkungen der Konditionierung mit Ammoniaklösung (pH 12.6) und Natriumhydroxidlösung

desselben pH-Werts verglichen. Im Unterschied zu [10] verursachte die Verwendung von Ammoniaklösung einen instabilen EOF, so dass weiterhin Natriumhydroxidlösung zur Konditionierung eingesetzt wurde. Um das Massenspektrometer dennoch nicht mit Natriumionen zu kontaminieren, wurden zwei Alternativverfahren zur Konditionierung und Äquilibration entwickelt. Vorher unbenutzte Kapillaren wurden nicht mit dem Massenspektrometer verbunden, sondern frei schwebend aus dem CE-Gerät geführt. Dann wurde durch Spülen mit Natriumhydroxidlösung konditioniert und anschließend mit BGE äquilibriert. Die eluierten Flüssigkeiten wurden von Zellstoff aufgenommen. Bei diesem Verfahren konnte während der Äquilibration keine Spannung angelegt werden, da der Stromkreis nicht geschlossen war. In separaten Untersuchungen wurde sichergestellt, dass der Verzicht auf Spannung keine negativen Auswirkungen auf die Äquilibration hat und die Stabilität der resultierenden EOF vergleichbar ist. Sollte bei einer bereits verwendeten und damit auch konditionierten Kapillare der BGE gewechselt werden, wurde die Kapillare nicht aus dem Interface genommen (um die Position nicht zu verändern), sondern durch Spülen mit dem anderen BGE auf den neuen pH-Wert äquilibriert.

7.1.4 Entwicklung des sheath liquid

Das sheath liquid wurde unter der Prämisse „möglichst hohe Ionenintensitäten bei möglichst hoher Spraystabilität“ entwickelt, wobei die Stabilität der Basislinie und die Peakform als Orientierung für die Spraystabilität dienten. Dazu wurden die folgenden Zusammensetzungen getestet: Isopropanol oder Methanol-Wasser-Mischungen im Verhältnis 50:50 (v/v) oder 80:20 (v/v), mit einem Anteil Eisessig von 5, 2, 1 oder 0.5%. Die Flussrate wurde in einem Bereich von 2 – 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ variiert. Ein sheath liquid aus Isopropanol/Wasser in einem Verhältnis 80:20 (v/v) mit 1% Eisessig bei einer Flussrate von 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ ergaben die besten Ergebnisse, besonders im Hinblick auf die Intensität des Nikotinsäuresignals. Bei allen Messungen wurde das gleiche sheath liquid verwendet, um einen Einfluss eines veränderten sheath liquid pH-Werts auszuschließen.

7.1.5 Parameter am Massenspektrometer

Weiterhin wurden die Interfaceparameter „Trocknungsgas“ (6 L/min bei 200 °C) und „nebulizer gas“ (10 psi) optimiert. An den Einstellungen des Analysators wurden nur die Sprayspannung auf ein stabiles Spray hin optimiert (-4000 V) und die Fragmentorspannung (35 V) eingestellt. Durch die Spannungswahl des Fragmentors ist es möglich, Analytionen zu fragmentieren und so auf ihre Struktur zu schließen. In den hier gezeigten Untersuchungen wurde die Fragmentorspannung zum Aufspalten von möglicherweise vorhandenen Natriumaddukten und Wasserclustern verwendet. Der Erfolg dieses Verfahrens wurde mit einem Massenscan in einem Bereich von m/z 100 bis m/z 600 überprüft, da solche „Derivate“ des Analytions die Konzentrationsbestimmungen verfälschen würden (Kap. 6.2.2).

7.1.6 Entwicklung des Kapillarpositionierungsverfahrens

Wie bereits erwähnt, dient der sheath-flow primär der elektrischen Verbindung zur Trennkapillare sowie zur Kompensation des niedrigen eluierten Volumens aus der Kapillare. Um eine zusätzliche Peakverbreiterung durch die Verdünnung mit dem sheath liquid zu vermeiden, sollte das zu mischende Volumen von Probe und sheath liquid möglichst gering gehalten werden [52]. Schwankungen im Vermischungsprozess, z.B. durch unregelmäßiges Pumpen des sheath-flow [49], können zu Variationen im Ionisationsprozess führen. Die reproduzierbare Positionierung der Trennkapillare im Verhältnis zum sheath-flow ist zur Kontrolle dieser Varianzursachen unerlässlich [50-52, 59, 88]. Die Position der Kapillare im Interface muss von der Position der kompletten Sprayereinheit vor dem Eingang zum Analysator unterschieden werden. Bei den meisten kommerziellen sheath-flow Interfaces ist die Position des Interface fixiert und kann nicht, wie bei Nanosprayinterfaces üblich, verändert werden. Dennoch ist konstruktionsbedingt eine ausreichende Transferrate der Ionen in den Analysator gewährleistet. In Abb. 6.2.3-1 wurde bereits der Einfluss der Kapillarposition auf die Signalintensität dargestellt. Bei einem Kapillarwechsel wird die Position im Interface verändert und damit in den meisten Fällen auch die Signalintensität. Es erschien daher sinnvoll, diese Intensitätsänderung als Indikator für die Kapillarposition zu verwenden. Bei den

ersten Versuchen wurde in Blindproben ein Neostigminsignal entdeckt, dessen Ursprung im Neostigmin, das an der Kapillarwand adsorbiert war, liegt. Mehrere aufeinander folgende Messungen, ursprünglich um den Reinigungserfolg von Spülprozeduren zu überprüfen, ergaben kein Nachlassen der Signalintensität. Daher wurde das Signal des Neostigminübertrags, mit der Annahme, dass sich die Intensitäten der anderen Analyten genauso verhalten, als Indikator zur Kapillarpositionierung verwendet. Im Methodenteil (Kap. 11.7.2) wird das Positionierungsverfahren der Kapillare genau beschrieben.

In dieser Arbeit wurden den verwendeten Kapillaren die Buchstaben „A“ – „H“ zugeordnet, um eine Unterscheidung zu ermöglichen. Durch einen Kapillarwechsel ändert sich auch die Position, so dass dieselben Buchstaben synonym für die Kapillarpositionen verwendet werden. Trotz des Positionierungsverfahrens sind zwischen den Ergebnissen mit den einzelnen Kapillaren Unterschiede zu erkennen, deren Ursache in den nicht planen Schnittflächen der Kapillarenden liegt. Es wurde versucht, diesen Faktor durch die Überprüfung der Kapillarenden mit einer Stereolupe zu minimieren. Bei der Vermessung derselben Probe mit verschiedenen Kapillaren resultierten dennoch variable Signalintensitäten (Abb. 7.2.5-1 und 7.2.5-2), deren Schwankungen allerdings niedriger als ohne Positionierungsverfahren ausfallen, wie an Tabelle 12.2-2 (BGE bei pH 8.5, 0.02 mM Probe; Position „A“, „F“-„H“) abgelesen werden kann.

7.1.7 Datenintegration und Datenauswertung

Bei der Auswertung wurden nicht ausreißerbereinigte Datensätze verwendet, da bei der Charakterisierung eines analytischen Systems auch außergewöhnliche Einzeldaten eine wichtige Aussage zur Systempräzision oder Ursachen für Variationen liefern können. Gerade bei Systemen, bei denen die Ursachen für Variationen noch nicht geklärt sind, ist es schwierig zu entscheiden, ab wann ein Wert als Ausreißer zu betrachten ist und ab wann es sich um einen Wert innerhalb der „natürlichen“ Systemschwankung handelt. Zusätzlich wurde einer unbewussten „RSD%-Beeinflussung“ durch eine „gezielte“ Ausreißerkorrektur vorgebeugt.

Bei der Integration der Daten wurde ebenfalls versucht einer unbewussten Manipulation vorzubeugen, indem nicht, wie sonst üblich, jedes einzelne Elektropherogramm durch eine individuelle Anpassung der Integrationsparameter

optimal integriert wurde. Stattdessen wurden möglichst allgemeingültige Integrationsparameter auf die komplette Messreihe angewendet. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass einige Elektropherogramme unbefriedigend oder gar nicht integriert werden. So sind gerade durch das Peak tailing bei Neostigmin bei der Integration mit der Chemstationsoftware einige Peaks in mehreren Teilabschnitten integriert worden. Bei der Auswertung wurden die Teilabschnitte manuell zu einer Gesamtpeakfläche addiert und so eine weitere mögliche Ursache für Variationen eingeführt. Um das Ausmaß dieser Variationen zu überprüfen, wurden die Datensätze mit dem Integrationsprogramm KISS nachintegriert, da Algorithmen dieses Programms die Festlegung allgemeingültiger Integrationsparameter ohne Auftrennen der Peakflächen erlaubt. Der Vergleich der RSD% der Peakflächen nach der Auswertung mit beiden Programmen ergab keinen signifikanten Unterschied, so dass der Fehler durch die Addition der Peakflächen zu gering ausfällt, um bei der hohen Datenzahl der Messreihen einen signifikanten Einfluss zu haben.

Im Verlauf der ersten Auswertungen stellte sich heraus, dass die Präzision besser abzuschätzen war, wenn anstelle der relativen Peakflächen (der prozentuale Anteil einer Peakfläche an der Summe aller Peakflächen im Elektropherogramm), die absoluten Peakflächen herangezogen wurden, wie an folgendem Beispiel erläutert. Eine Probe enthält zwei Substanzen, die in einem Elektropherogramm als zwei Peaks mit einer relativen Peakfläche von 99.9% beziehungsweise 0.1% erscheinen. Diese Probe wird mehrfach vermessen und die RSD% bestimmt. Aufgrund des hohen Anteils an der Gesamtpeakfläche, wirken sich Variationen der absoluten Peakfläche des größeren Peaks rechnerisch nicht auf seine relative Peakfläche aus. Die RSD% geht dann folglich gegen Null, so dass keine repräsentative Aussage zur Präzision des großen Peaks getroffen werden kann.

7.2 Versuche mit strukturfremdem Internen Standard (Probe I)

Die Zusammensetzung dieser Probe basiert auf einer bereits bestehenden Probe zur Testung der Präzision von Kapillarelektrophoreseinstrumenten [93, 94] (Kap. 7.1.1). Sowohl die heterogene Zusammensetzung der Probe, als auch die „unvorteilhafte“ Auswahl des Internen Standards (Auswahlkriterien: Kap. 5.3) kommen in der analytischen Praxis eher selten vor. Dennoch bietet diese Probe den Vorteil einer gleichzeitigen Untersuchung des Verhaltens von in Lösung unterschiedlich geladenen Molekülen bei der ESI. Neostigmin wurde als Interner Standard ausgewählt, da das Molekül aufgrund der positiven Ladung seines quartären Stickstoffatoms unabhängiger von Einflüssen auf die Ionisation sein sollte. Paracetamol ist bei beiden untersuchten pH-Werten weitgehend ungeladen, muss also erst im Interface in einen geladenen Zustand überführt werden und fungiert außerdem noch als EOF-Marker. Die während der Trennung als Anion vorliegende Nikotinsäure muss zur Detektion im Massenspektrometer bei der Ionisierung im Interface durch zweifache Protonenanlagerung in ein Kation umgewandelt werden. Es wurde vermutet, dass sich die in den Vorversuchen gezeigte geringe Ionisierbarkeit dieser Verbindung in einer geringen Präzision niederschlägt.

Im Anhang dieser Arbeit bieten die Tabellen 12.2-1 und 12.2-2 eine nach der Kapillarposition bzw. der Probenkonzentration sortierte Gesamtübersicht über sämtliche Untersuchungen mit Probe I.

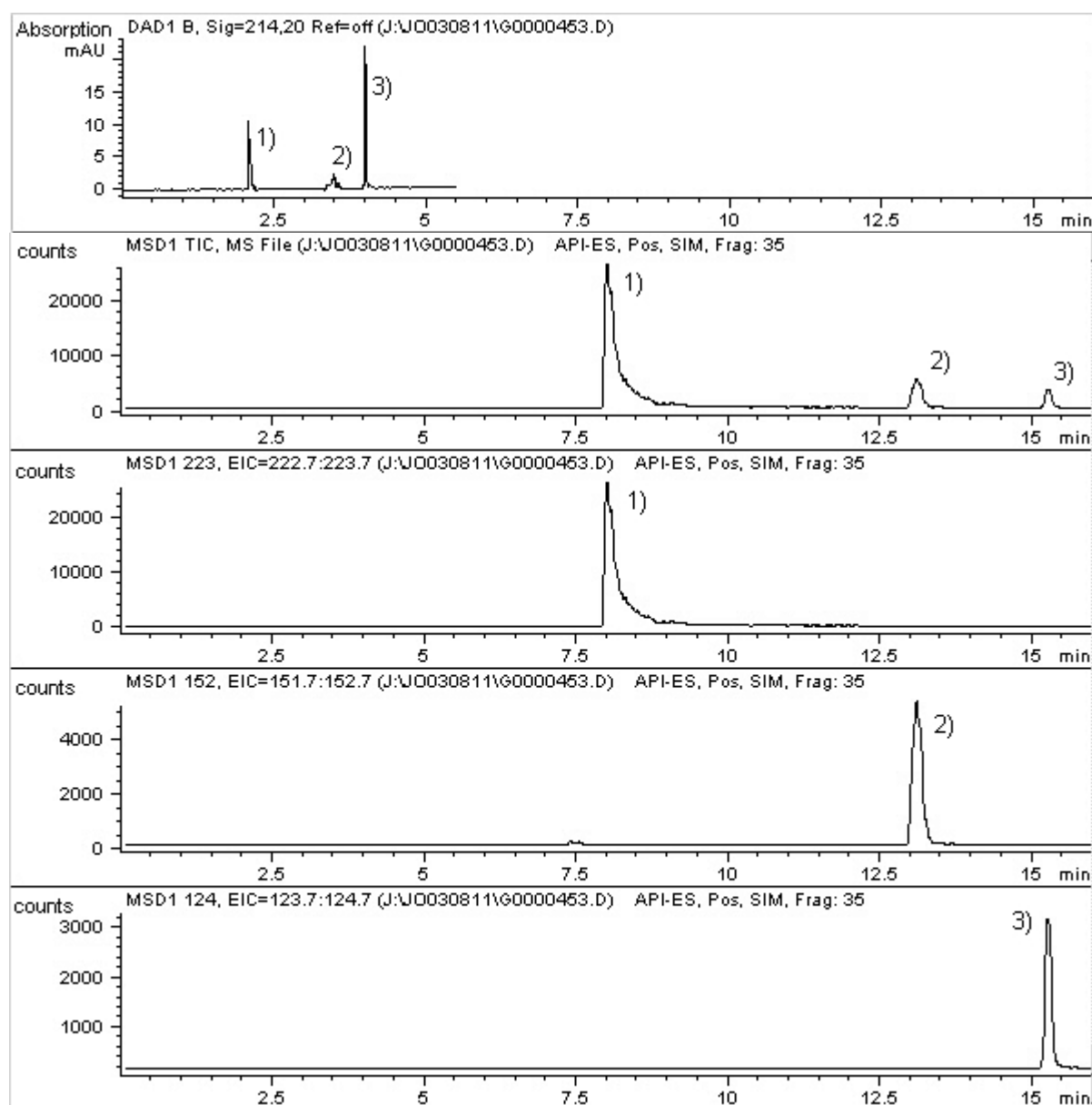


Abb. 7.2-1: Elektropherogramme der Trennung der 0.2 mM Probe bei pH 4.0 (Kapillarposition „C“; Migrationsfolge (von links nach rechts): 1) Neostigmin, 2) Paracetamol, 3) Nikotinsäure). Für das oberste Elektropherogramm wurde UV-Detektion bei 214 nm verwendet. Darunter ist ein Totalionenstromelektropherogramm (TIE) abgebildet, dass die Intensitäten aller Ionen mit den m/z -Werten 223, 152 und 124 abbildet. Für die letzten drei Graphen wurden aus dem TIE die m/z -Verhältnisse der einzelnen Analyten in separaten „extrahierten-Ionen-Elektropherogrammen“ (EIE) abgebildet.

7.2.1 Erhöhung der Präzision durch einen Internen Standard

Die Vorteile, die der Einsatz Interner Standards in der Analytik bringt, wurden bereits in Kap. 5.3 erläutert.

Um das mögliche Potential eines Internen Standards zu zeigen, wurden die relativen Standardabweichungen der Peakflächen zweier Messserien der 0.2 mM Probe bei pH 8.5 und gleicher Kapillarposition herangezogen, wobei in der Praxis keiner der Analyten wegen der fehlenden Analogie zu den anderen beiden Substanzen als Interner Standard ausgewählt worden wäre. Trotzdem ist, unabhängig von dem als Internen Standard verwendeten Substanzpeak, eine Verbesserung der Präzision erkennbar.

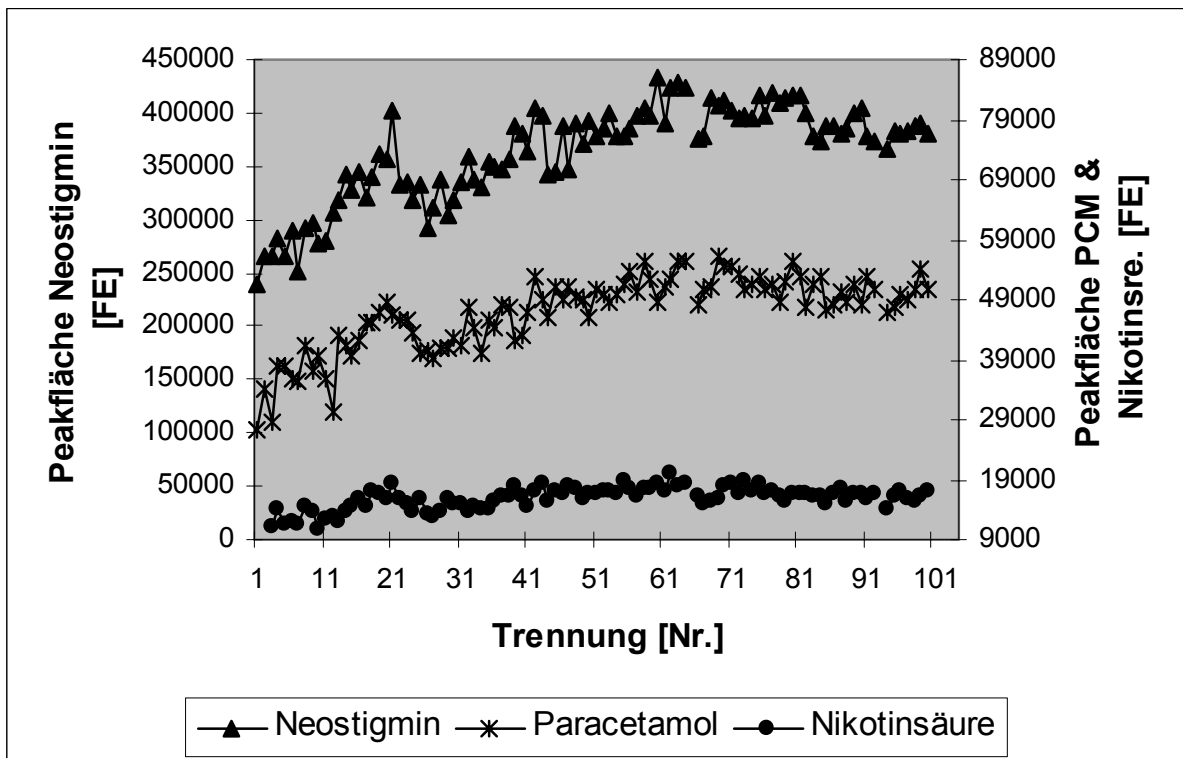
	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
	1.Serie			2.Serie		
absolute Peakflächen						
Neostigmin	363000	12.4	98	373000	9.71	100
Paracetamol	46900	13.1	98	44500	15.4	100
Nikotinsäure	15900	11.7	96	14900	15.8	100
Peakflächenverhältnis						
Paracet./Neostigm.	0.13	6.59	98	0.12	7.80	100
Nikotinsre./Neostigm.	0.04	7.17	98	0.04	8.37	100
Neostigm./Paracet.	7.78	7.00	98	8.47	7.91	100
Nikotinsre./Paracet.	0.34	8.51	96	0.34	5.90	100
Neostigm./Nikotinsre.	23.1	7.10	96	25.3	8.48	100
Paracet./Nikotinsre.	2.99	8.29	96	2.99	6.03	100

Tab. 7.2.1-1: Erhöhung der Präzision zweier Messserien der 0.2 mM Probe bei pH 8.5 durch die Verwendung eines Internen Standards (Kapillarposition „B“). Einheiten der Peakflächen bei MS-Detektion in allen Tabellen: Flächeneinheiten [FE]. Unter „Peakflächenverhältnis“ ist der Mittelwert aus dem Quotienten aus einzelnen Analytpeakflächen und der IS-Peakfläche aus derselben Trennung angegeben. Bei den dazugehörigen RSD%-Werte handelt es sich nicht um den Quotienten der RSD%-Werte der beiden Peakflächen, sondern um die RSD% der einzelnen Peakflächenquotienten der Messreihe.

Bei dem Vergleich der RSD% der absoluten Peakflächen mit den RSD% der Peakflächenverhältnisse wird eine Senkung der Werte um bis zu 9.9 Prozentpunkte (2. Messserie, Nikotinsäure) deutlich. Wie aus Tabelle 7.2.1-1 hervorgeht, tritt die Verbesserung unabhängig von der als IS genutzten Substanz auf. Die Präzision des Neostigminpeaks ist in den meisten Fällen am höchsten (siehe auch folgende Tabellen). Eine mögliche Erklärung ist, dass der Protonierungsschritt zur Ionisierung vor der Überführung des Ions in die Gasphase bei diesem Molekül entfällt. Bei der eben erläuterten Ionisierungsreaktion handelt es sich um eine Art Derivatisierungsreaktion, welche die von anderen Derivatisierungen bekannten

Schwächen bezüglich Ausbeute und Reproduzierbarkeit, sowie der Stabilität der Derivate beinhaltet und daher eine mögliche Ursache für Variabilität bei der Quantifizierung mit ESI-MS ist.

Das Entfallen dieser Varianzursache sollte das Permanentkation Neostigmin in dieser Probe zum geeignetsten IS machen. In den meisten Fällen ist auch die RSD% des Quotienten aus Analytpeak und Neostigminpeak kleiner als bei der Wahl eines anderen Analyten als IS, obwohl eine deutliche Überlegenheit des Neostigmins nicht erkennbar ist.



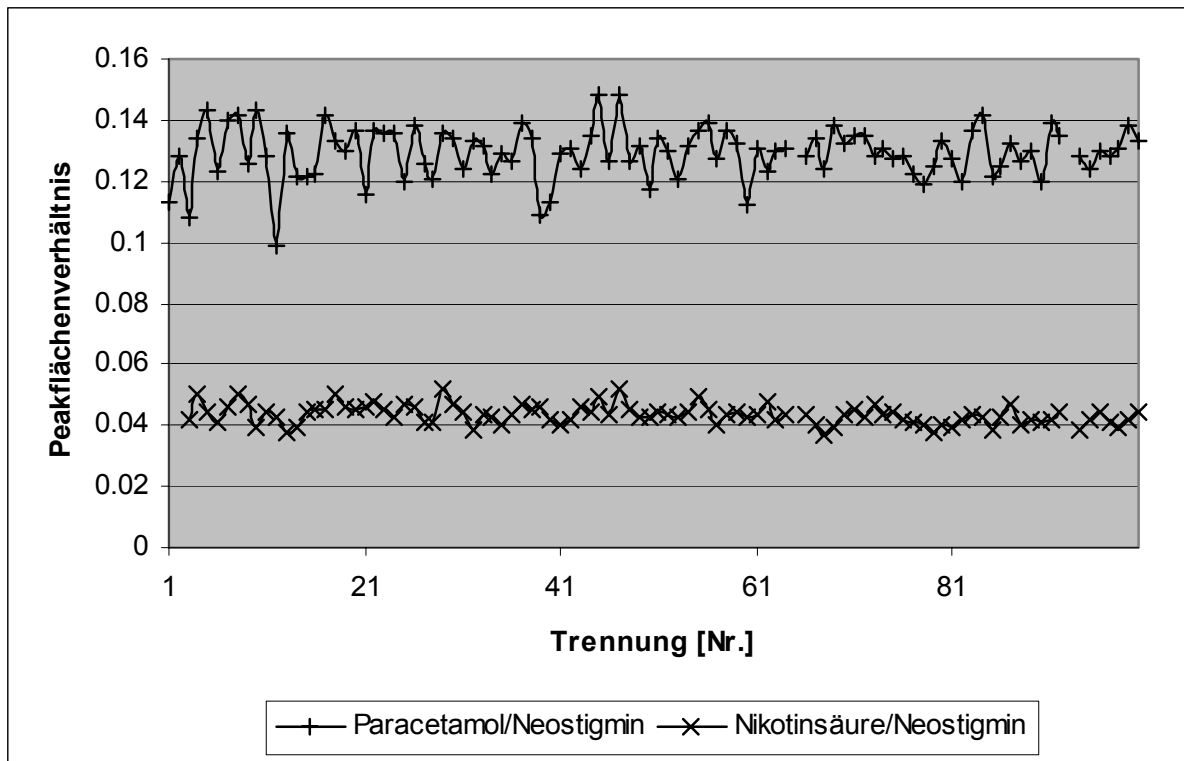


Abb. 7.2.1-1: Die graphische Darstellung der absoluten Peakflächen der ersten Messserie (oben) macht einen weiteren Vorteil von IS deutlich: Trends werden, wie in der unteren Abbildung erkennbar, durch die Quotientenbildung herausgemittelt. „Brüche“ in den Graphen entstehen durch nicht auswertbare Elektropherogramme innerhalb der Messserien.

In einigen Fällen ist die Präzision der absoluten Peakflächen höher als die der Quotienten aus Peakfläche und IS [25]. Wie im folgenden Beispiel gezeigt, könnte die Ursache hierfür in den höheren RSD%-Werten der Peakflächen des gewählten IS (Neostigmin) liegen, denen möglicherweise ein erhöhter Integrationsfehler durch Tailing des Neostigmins in Kombination mit den konstanten Integrationsparametern (Kap. 7.1.7) zu Grunde liegt. Die niedrigeren RSD%-Werte der Flächenverhältnisse bei Verwendung der anderen beiden Analyten als IS zeigen den negativen Einfluss der niedrigen Präzision des Neostigminpeaks auf die Präzision des Quotienten Analyt/Neostigmin.

	Peakfläche	RSD [%]	n
Neostigmin	1200000	17.3	99
Paracetamol	237000	13.0	99
Nikotinsäure	147000	14.0	91
Peakflächenverhältnis			
Paracet./Neostigm.	0.201	13.8	99
Nikotinsre./Neostigm.	0.124	14.4	91
Neostigm./Paracet.	5.05	12.5	99
Nikotinsre./Paracet.	0.62	6.55	91
Neostigm./Nikotinsre.	8.23	13.0	91
Paracet./Nikotinsre.	1.63	7.07	91

Tab. 7.2.1-2: Geringfügige Verschlechterung der Präzision durch Verwendung eines Internen Standards (Peakflächenverhältnis Analyt/Neostigmin). Konzentration der Probe: 2.0 mM, BGE: 10 mM Ammoniumacetat pH 8.5, Kapillarposition „B“.

7.2.2 Präzision der Peakflächen bei UV- und massenspektrometrischer Detektion

Die Gesamtvarianz bei Verwendung von UV-Detektion ist signifikant geringer als bei MS-Detektion, so dass relative Standardabweichungen der Peakflächen bis zu 1% erreichbar sind [22]. Bei der CE-UV setzt sich die Gesamtvarianz der Peakflächenreproduzierbarkeit aus den Varianzkomponenten Injektion, Konvektion, Diffusion, Wandinteraktionen und Integration zusammen [25], wobei die Injektion einen großen Anteil an der Gesamtvariabilität hat [99]. Bei der Detektion mit einem Massenspektrometer kommen unter anderem noch die Ionisierung und der Übergang der Moleküle in die Gasphase als wesentliche Varianzkomponenten hinzu. Da die Trennung der Probe zweifach detektiert wurde, ist es durch Differenzbildung näherungsweise möglich, die Anteile der UV-Varianzkomponenten aus der MS-Varianz herauszurechnen. So kann der Beitrag der Vorgänge im Interface zur Gesamtvarianz abgeschätzt werden. Dazu wurden die Präzisionen beider in Tabelle 7.2.1-1 vorgestellten Serien untersucht und mit den UV-Daten verglichen. Eine genaue Zuordnung der Varianzursachen ist nicht möglich, da beispielsweise durch die unterschiedliche effektive Kapillarlänge die Konvektion und Diffusion unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die durch diese Faktoren ausgelösten Variationen können besonders im nicht-thermostatisierten Teil der Kapillare auftreten

und so die MS-Detektion wesentlich stärker beeinflussen. Ebenso wird das Ausmaß der Wandinteraktionen, besonders bei Neostigmin, von der Kapillarlänge bestimmt.

Da bei der Bestimmung der Gesamtvarianz durch Addition von Teilvarianzen mit der Varianz $\hat{\sigma}^2$ anstelle der Standardabweichung gerechnet werden muss (Kap. 5.2.3), sind die Standardabweichungen zu quadrieren. Für den Vergleich der Präzisionen der UV- und MS-Detektion ist es jedoch sinnvoller, die RSD% zu quadrieren, da sich die nominellen Werte der absoluten Standardabweichungen durch die unterschiedlichen Größenordnungen der Peakflächen zu stark unterscheiden, so dass mit einem F-Test keine sinnvolle Aussage zu treffen wäre. Das Teilen der Standardabweichungen durch die Mittelwerte relativiert die Größenordnungen und ein Vergleich wird möglich.

Detektion	UV				MS			
	Peakfläche [mAU]	RSD [%]	RSD ² [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	RSD ² [%]	n
1. Serie								
Neostigmin	15.3	6.09	37.1	93	363000	12.4	153.8	98
Paracetamol	22.2	4.74	22.5	93	46900	13.1	171.6	98
Nikotinsäure	25.6	5.27	27.8	93	15900	11.7	136.9	96
Peakflächenverhältnis Paracet./Neostigm.	1.45	3.18	10.1	93	0.129	6.59	43.4	98
Nikotinsre./Neostigm.	1.68	4.49	20.2	93	0.043	7.17	51.4	98
2. Serie								
Neostigmin	15.2	4.17	17.4	95	373000	9.71	94.3	100
Paracetamol	20.8	5.19	27.0	95	44500	15.4	237.2	100
Nikotinsäure	25.1	4.66	21.7	95	14900	15.8	249.6	100
Peakflächenverhältnis Paracet./Neostigm.	1.37	3.26	10.6	95	0.119	7.80	60.8	100
Nikotinsre./Neostigm.	1.66	3.90	15.2	95	0.040	8.37	70.1	100

Tab. 7.2.2-1: Die aus Tabelle 7.2.1-1 bekannten Serien (rechts) mit den Präzisionsdaten der UV-Detektion bei 214 nm (links).

Die einzelnen Werte für die Größe der Peakflächen stammen bei beiden Detektionsverfahren aus der Trennung derselben Probeninjektion. Daher wirken sich Variationen der Injektion auf die Peakgröße bei beiden Verfahren gleich aus. Werden Differenzen aus den „relativen Varianzen“ der absoluten Peakflächen gebildet, liegt das Ergebnis noch nahe an dem Wert der MS-Detektion. Die kleine Differenz zwischen Gesamt- und MS-Varianz zeigt den geringen Anteil der bei der UV-Detektion wichtigen Varianzkomponenten auf die Gesamtvarianz bei MS-Detektion

und unterstreicht die Notwendigkeit eines möglichst gut kontrollierten Ionisierungsprozesses. Auf eine Untersuchung der Daten mit dem F-Test wurde verzichtet, da schon bei einem direkten Vergleich der quadrierten RSD%-Werte von UV- und MS-Detektion erkennbar ist, dass sich die Werte um bis zu eine Größenordnung unterscheiden – also ein signifikanter Unterschied der RSD% vorliegen muss.

Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen bei UV-Bestimmungen sind im Vergleich zu anderen Messungen mit reiner UV-Detektion relativ hoch (RSD% bis 1% möglich [22]). Die Werte sind auch im Vergleich zu den in den Vorversuchen erhaltenen Daten mit der gleichen Probe erhöht. Die Gründe für diese Beobachtung könnten in der Sogwirkung des sheath liquid und nebulizer gas während der Injektion [8] liegen.

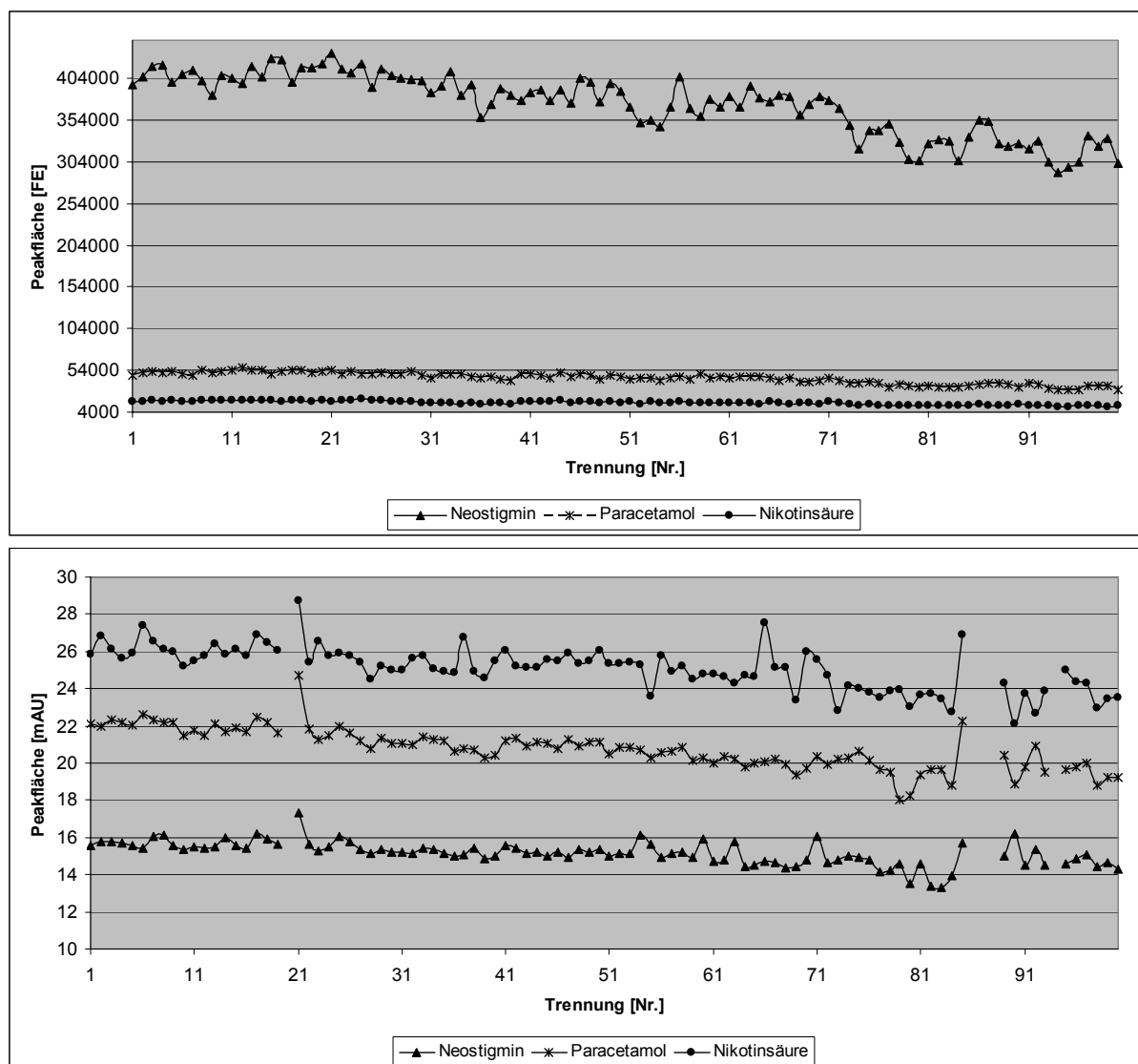


Abb. 7.2.2-1: Peakflächen der einzelnen Läufe der zweiten Messserie bei pH 8.5. Oben: MS-Detektion; unten: UV-Detektion bei 214 nm. Das unterschiedliche Ansprechen der Analyten auf die Detektionsverfahren [100] wird besonders beim Neostigmin deutlich, bei dem bei UV-Detektion bei gleicher Konzentration des Analyten die kleinsten, bei MS-Detektion mit Abstand die größten Peakflächen resultieren. Die „Lücken“ innerhalb der Graphen entstehen durch nicht auswertbare Elektropherogramme.

7.2.3 Einfluss des pH-Werts des Hintergrundelektrolyten auf Peakfläche und Präzision

Bei der Bestimmung des pH-Wert-Einflusses auf die Präzision werden nur Daten, die mit derselben Kapillare gemessen wurden, einbezogen, um die Auswirkungen unterschiedlicher Kapillarpositionen und –schnitte auf das Ergebnis zu minimieren.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0								
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02		
Neostigmin	1900000	25.5	49	384000	15.3	58	86800	14.3	59
Paracetamol	411000	44.2	59	82900	21.1	58	10900	22.1	58
Nikotinsäure	155000	59.4	57	30500	26.4	58	777	54.8	58
Peakflächenverhältnis									
Paracet./Neostigm.	0.23	34.0	49	0.22	16.9	58	0.13	25.7	58
Nikotinsre./Neostigm.	0.09	42.8	47	0.08	24.5	58	0.01	52.8	58
BGE	pH 8.5								
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02		
Neostigmin	1210000	18.7	60	273000	9.57	60	72000	17.1	60
Paracetamol	299000	25.7	60	75200	14.1	60	12500	25.3	60
Nikotinsäure	196000	26.8	60	36300	22.7	60	282	56.4	33
Peakflächenverhältnis									
Paracet./Neostigm.	0.24	22.7	60	0.28	8.75	60	0.17	15.7	60
Nikotinsre./Neostigm.	0.16	24.7	60	0.13	20.1	60	0.01	47.3	33

Tab. 7.2.3-1: Absolute Peakflächen der drei untersuchten Konzentrationen von Probe I mit den dazugehörigen relativen Standardabweichungen. Bei allen Untersuchungen wurde Kapillarposition „A“ verwendet.

7.2.3.1 Einfluss des pH-Werts auf die absolute Peakfläche

Nach den ESI-Theorien fördert die erhöhte Konzentration an Hydroniumionen im sauren BGE die Protonierung der Analyten und somit die Ionisierung, was sich in größeren Peakflächen ausdrücken sollte. Diese Überlegung wird bei der Betrachtung der Peakflächen von Neostigmin und Paracetamol bestätigt. Interessanterweise folgt auch die Peakfläche des Neostigmins diesem Trend, obwohl dieses Molekül nicht nach dem Schema $[M+H^+]$ ionisiert wird. Eine zusätzliche Protonierung kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall ein Signal bei einem m/z-Wert von 112 resultieren müsste, das aber nicht detektiert wurde.

Bei der Betrachtung von Veränderungen durch die BGE-Zusammensetzung darf nicht vergessen werden, dass der Hauptteil der Hydroniumionen aus dem sheath liquid stammt (ca. 0.52 $\mu\text{mol}/\text{min}$) und somit die Ionisierungsbedingungen hauptsächlich vom sheath-flow bestimmt werden (zum Vergleich: $\mu_{\text{EO,pH } 8.5} = 9.23 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ entsprechen ca. 116 nmol/min).

Dennoch muss gerade bei der Verwendung des alkalischen BGE der gesamte Pufferbereich vom Alkalischen zum Sauren durch das sheath liquid kompensiert

werden, was die unterschiedliche Ionisierungsausbeute erklären könnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die unterschiedliche Flussrate aus der Kapillare. In [50] wird im Zusammenhang von Änderungen in der Zusammensetzung des BGE auf unterschiedliche Signalintensitäten durch einen variablen EOF hingewiesen. Bei den verwendeten BGE ist der resultierende EOF bei einem pH-Wert von 4.0 sehr viel geringer (2.2 nL/min) als bei pH 8.5 (4.3 nL/min). Trotz des sheath-flow könnten hier die Vorteile der geringen Flussrate ähnlich dem Nanospray zu Tage treten. Auch wenn diese Theorie aufgrund des fehlenden detaillierten Wissens über die Vorgänge im Spray schwer zu beweisen ist, wäre es eine Erklärung für den Einfluss des pH-Werts auf die Signalintensität des Neostigmins.

7.2.3.2 Einfluss des pH-Werts auf die Präzision der Peakfläche

Die erreichbare Präzision bei den absoluten Peakflächen liegt bei beiden pH-Werten bei einer RSD% zwischen 10 und 25% (Tab. 7.2.3-1). Wie erwartet, ist die RSD% des Neostigminpeaks bei allen Messungen niedriger als die der anderen beiden Analytpeaks. Nutzt man den Neostigminpeak als IS, so liegen die RSD% mindestens 1.9 Prozentpunkte unter dem Wert ohne IS (Ausnahme: 0.02 mM Paracetamol bei pH 4.0). Die bei pH 4.0 für die 2.0 mM Proben erhaltenen RSD%-Werte sind aufgrund eines sehr niedrigen S/N sehr viel schlechter als sonst für diese Probe üblich (vgl. Tab. 7.2.5-1, Position „C“; pH 4.0). Bei Paracetamol könnte die niedrige Präzision unter anderem an der Aufspaltung des Paracetamolpeaks liegen. Dieses Verhalten wird in [101] beschrieben und tritt unregelmäßig auf. Bisher wurde noch keine schlüssige Erklärung für die Entstehung dieses Phänomens gefunden.

Eine weitere Ursache für die geringe Präzision bei dieser Konzentration wird nach Tabelle 7.2.3-2 im Zusammenhang mit dem F-Test erläutert. Bei einer Konzentration von 0.02 mM kommt unter anderem die vergleichsweise schlechte Ionisierbarkeit der Nikotinsäure zum Tragen, da bei der geringen Konzentration die unstetige Ionisierung zu einem geringeren Signal-Rausch-Verhältnis und somit zu einem größeren Integrationsfehler führt.

	<i>RSD [%]</i>	<i>(RSD [%])²</i>	<i>n</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>(RSD [%])²</i>	<i>n</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>(RSD [%])²</i>	<i>n</i>
BGE	<i>pH 4.0</i>								
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02		
Neostigmin	25.5	650.3	49	15.3	234.1	58	14.3	204.5	59
Paracetamol	44.2	1954	59	21.1	445.2	58	22.1	488.4	58
Nikotinsäure	59.4	3528	57	26.4	697.0	58	54.8	3003	58
BGE	<i>pH 8.5</i>								
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02		
Neostigmin	18.7	349.7	60	9.57	91.58	60	17.1	291.5	60
Paracetamol	25.7	660.5	60	14.1	198.8	60	25.3	640.6	60
Nikotinsäure	26.8	718.2	60	22.7	515.3	60	56.4	3179	33
Vgl. des pH-Werts	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>
Quotient Neostig.	1.86	1.89	-	2.56	1.85	+	1.43	1.85	-
Quotient Paracet.	2.96	1.85	+	2.24	1.85	+	1.31	1.86	-
Quotient Nikotins.	4.91	1.86	+	1.35	1.86	-	1.06	2.17	-
Vgl. d. Konz. pH 8.5	2.0 vs. 0.2			0.2 vs. 0.02			2.0 vs. 0.02		
Quotient Neostig.	3.82	1.85	+	3.18	1.85	+	1.20	1.85	-
Quotient Paracet.	3.32	1.85	+	3.22	1.85	+	1.03	1.85	-
Quotient Nikotins.	1.39	1.85	-	6.17	2.16	+	4.43	2.16	+

Tab. 7.2.3-2: Ergebnisse des F-Tests ($\alpha = 0.01$) beim Vergleich von RSD%-Werten der Peakflächen bei pH 4.0 und pH 8.5 aus Tabelle 7.2.3-1. „+“: signifikanter Unterschied festgestellt; „-“: kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen festgestellt.

In Kapitel 5.2.1 wird die Verwendung des F-Tests zum Vergleich von Präzisionen bereits beschrieben. Dieser Test wird beispielsweise bei Methodentransfers eingesetzt, um nachzuweisen, dass sich die Präzision der Methode durch den Transfer nicht verändert hat. In einem solchen Zusammenhang wird sinnvollerweise mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% ($\alpha = 0.1$) gearbeitet, da so die Wahrscheinlichkeit eines β -Fehlers (fälschliche Annahme der Nullhypothese: „es besteht kein Unterschied in der Präzision“) sinkt. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde eine kleinere Irrtumswahrscheinlichkeit ($\alpha = 0.01$) zugrunde gelegt. Einerseits steigt dadurch die Gefahr eines β -Fehlers, es liegt also möglicherweise eher ein signifikanter Unterschied vor, obwohl das Testergebnis das Gegenteil aussagt, andererseits sinkt durch die geringe Irrtumswahrscheinlichkeit die Möglichkeit, dass der Test Signifikanz anzeigt, obwohl kein Unterschied vorliegt (fälschliches Verwerfen der Nullhypothese). Dadurch werden nur große Unterschiede zwischen zwei Präzisionen sicher vom Test erkannt und so die Aussage über Einflussfaktoren auf die Präzision erleichtert.

Bei der Betrachtung von Tabelle 7.2.3-2, den Ergebnissen des Präzisionsvergleichs mit dem F-Test, zeigt sich, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% eine Aussage über die pH-Abhängigkeit der Präzision aus diesen Daten nicht eindeutig für alle Proben hervorgeht.

Die Werte für die 2.0 mM Probe bei pH 4.0 sollten nicht in den Vergleich einbezogen werden, da hier größere Schwankungen als üblich auftraten. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte die allmähliche Zerstörung des Kapillarendes im Interface („electrodrilling“ [78]; Kap. 6.2.1) sein, denn die Kapillare war zu diesem Zeitpunkt bereits für ca. 840 Trennungen mit einer jeweiligen Laufzeit von 12 – 30 min verwendet worden. Für diese Ursache spricht ebenfalls, dass die Peakflächen der UV-Detektion dieser Messreihe nicht von Schwankungen betroffen waren.

Im Verlauf der Messreihe der 2.0 mM Probe tritt sowohl eine Abnahme der Signalintensität bei MS-Detektion, als auch ein Anstieg der Migrationszeit auf (Abb. 7.2.3-1). Bei der Untersuchung von Probe I wurde mit der geringsten Probenkonzentration begonnen, so dass die Konzentration 2.0 mM am Schluss der Messreihe lag. Daher liegen die Ergebnisse der niedrigeren Probenkonzentrationen im üblichen Bereich.

Bei der 0.2 mM Probe ist die Präzision bei einem pH-Wert von 8.5 höher als bei pH 4.0. Allerdings ist die Präzision der Peakfläche der 0.2 mM Probe auch höher als die der anderen beiden Probenkonzentrationen bei demselben pH-Wert. Der untere Abschnitt von Tabelle 7.2.3-2 macht den signifikanten Unterschied der Präzision zwischen den drei unterschiedlich konzentrierten Proben bei pH 8.5 deutlich, indem gezeigt wird, dass sich die Präzisionen der 2.0 mM und der 0.02 mM Probe nicht signifikant unterscheiden und die hohe Präzision der 0.2 mM Probe als positiver Ausreißer zu betrachten ist. Aus diesem Grund kann keine allgemeine Aussage beim Vergleich der Präzisionen der 0.2 mM Probe bei unterschiedlichen pH-Werten getroffen werden. Eine ausführliche Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der absoluten Peakflächen und der Präzision folgt in Kapitel 7.2.5.

Die Ergebnisse der 0.02 mM Probe weisen darauf hin, dass zwischen den Varianzen bei beiden pH-Werten kein signifikanter Unterschied besteht. Dennoch lässt sich eine allgemeine Aussage über den Einfluss des BGE-pH-Werts auf Peakgröße und Präzision aus den vorliegenden Daten nur teilweise treffen.

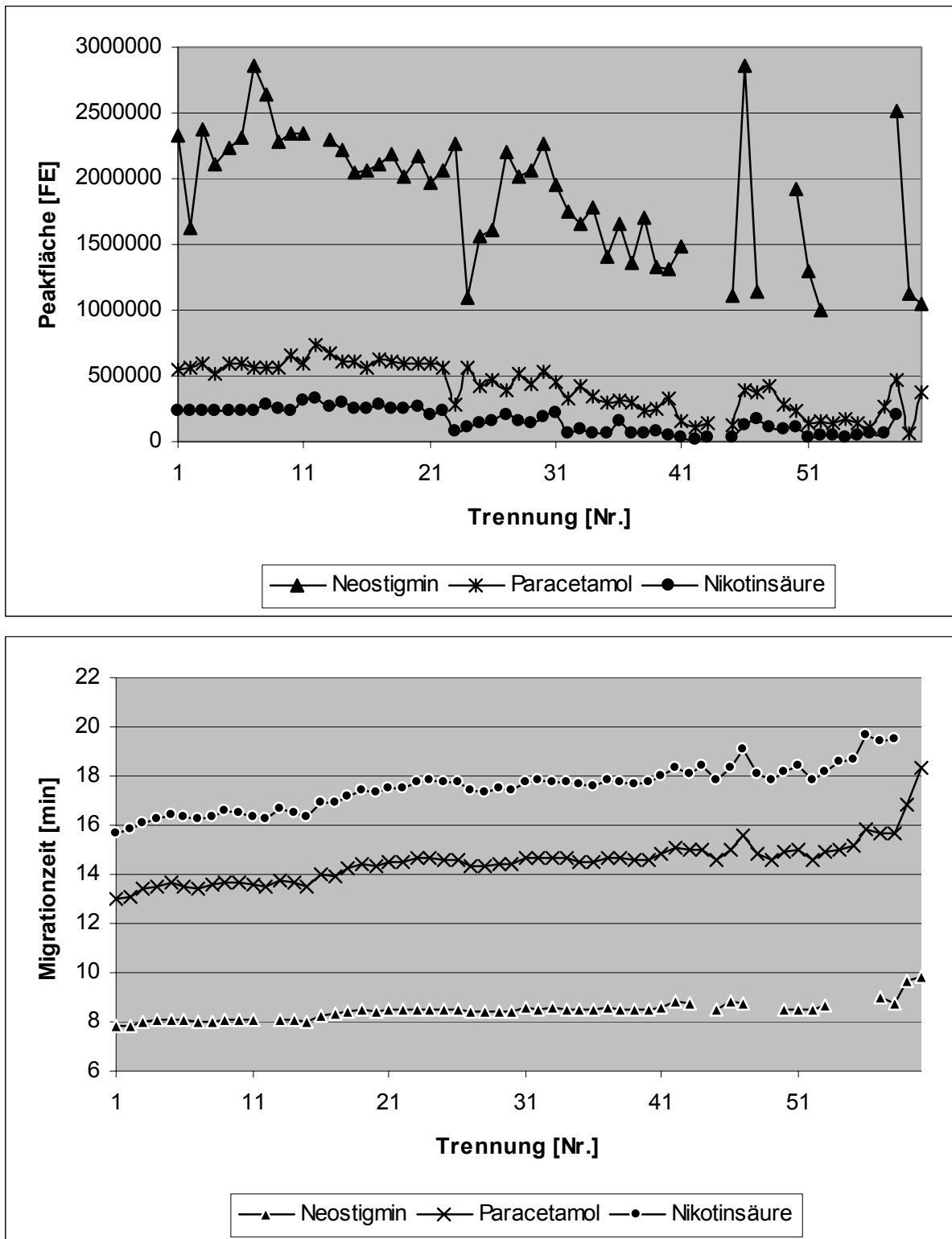


Abb. 7.2.3-1: Absolute Peakflächen (oben) und Migrationszeiten (unten) bei einem BGE pH-Wert von 4.0 und einer Probenkonzentration von 2.0 mM. Die Degradation der Kapillare lässt sich unter anderem an den vielen nicht bestimmbar Neostigminpeaks am Ende der Serie erkennen, die mit den am Anfang der Messserie gültigen Integrationsparametern nicht erfassbar sind.

Zur Bewertung der pH-Abhängigkeit von Peakfläche und Präzision wurden zuerst die Daten aus Tabelle 7.2.3-2 herangezogen, da in dieser Tabelle alle drei verwendeten Probenkonzentrationen und beide BGE-pH-Werte unter der Verwendung einer einzigen Kapillarposition untersucht wurden.

Um eine deutlichere Aussage zu erlangen, wurde ein weiterer Vergleich mit Daten von den Kapillarpositionen „B“ (pH 8.5) und „C“ (pH 4.0) durchgeführt. Bei pH 8.5 liegen bei einer Konzentration von 0.02 mM keine nutzbaren Daten vor, so dass ausschließlich die Präzisionen der höher konzentrierten Proben verglichen werden konnten (Tab. 7.2.3-3).

	<i>RSD [%]</i>	$(RSD [\%])^2$	<i>n</i>	<i>RSD [%]</i>	$(RSD [\%])^2$	<i>n</i>
BGE	<i>pH 4.0</i>					
Kapillarposition	<i>C</i>					
Probenkonz. [mM]	<i>2.0</i>			<i>0.2</i>		
Neostigmin	16.0	256.0	102	7.48	55.95	101
Paracetamol	18.7	349.7	99	11.2	125.4	99
Nikotinsäure	14.0	196.0	34	12.3	151.3	84
BGE	<i>pH 8.5</i>					
Kapillarposition	<i>B</i>					
Probenkonz. [mM]	<i>2.0</i>			<i>0.2</i>		
Neostigmin	17.3	299.3	99	12.4	153.8	98
Paracetamol	13.0	169.0	99	13.1	171.6	98
Nikotinsäure	14.0	196.0	91	11.7	136.9	96
Vergleich des pH-Werts	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>
Quotient Neostig.	1.17	1.60	-	2.75	1.60	+
Quotient Paracet.	2.07	1.61	+	1.37	1.61	-
Quotient Nikotins.	1.00	1.88	-	1.11	1.64	-

Tab. 7.2.3-3: Ergebnisse des F-Tests ($\alpha = 0.01$) eines erneuten Vergleichs von RSD%-Werten der Peakflächen bei pH 4.0 und pH 8.5. Im Vergleich zu Tabelle 7.2.3-2 wurden hier die Daten anderer Kapillarpositionen verwendet. „+“: signifikanter Unterschied festgestellt; „-“: kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen festgestellt.

Trotz der unterschiedlichen Kapillarpositionen weisen die Ergebnisse des F-Tests darauf hin, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die Präzision der Peakflächen hat. In Kapitel 7.3.2 wird der Einfluss dieser Parameter bei Versuchen mit deuteriertem IS erneut betrachtet.

7.2.4 Einfluss des Isopropanolgehalts des Hintergrundanalyten auf Peakgröße und Präzision

Wie bereits beschrieben, wurde ausschließlich Isopropanol als BGE-Zusatz untersucht, da dieses Lösemittel im sheath liquid die höchste Ionenausbeute ergab (Kap. 7.1.4). Ursprünglich sollten Anteile von 10% bis 50% untersucht werden, da sich aber bereits bei einem Zusatz von 10% die Migrationszeiten stark erhöhten, wurde auf eine Untersuchung höherer Isopropanolanteile verzichtet.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
<i>pH 4.0; 10% Isopropanol</i>									
BGE	<i>D</i>								
Kapillarposition									
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02		
Neostigmin	4239000	30.6	71	555000	25.2	94	105000	48.6	96
Paracetamol	861000	17.4	49	148000	23.4	84	34600	62.6	96
Nikotinsäure	411000	23.6	11	61000	26.2	44	2300	59.8	84
Peakflächenverhältnis									
Paracet./Neostigm.	0.19	20.3	49	0.26	8.30	82	0.33	38.1	94
Nikotinsre./Neostigm.	0.08	23.2	8	0.10	12.5	44	0.02	57.2	77
<i>pH 8.5; 10% Isopropanol</i>									
BGE	<i>E</i>								
Kapillarposition									
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02		
Neostigmin	2290000	50.1	92	923000	20.5	88	174000	38.1	63
Paracetamol	888000	43.9	94	356000	24.9	90	49000	63.5	65
Nikotinsäure	556000	45.1	77	170000	29.7	88	24000	73.2	59
Peakflächenverhältnis									
Paracet./Neostigm.	0.41	28.7	90	0.39	17.0	88	0.30	38.5	58
Nikotinsre./Neostigm.	0.23	33.3	74	0.18	26.0	86	0.17	55.3	35

Tab. 7.2.4-1: Die Peakflächen und RSD% von Neostigmin, Paracetamol und Nikotinsäure in drei unterschiedlichen Konzentrationen bei isopropanolhaltigen BGE mit unterschiedlichen pH-Werten.

Die in Tabelle 7.2.4-1 vorgestellten Ergebnisse zeigen einen Zuwachs der Peakfläche und eine verminderte Präzision bei der Zugabe von 10% Isopropanol zum BGE. Der Zusatz organischer Lösemittel sollte die Ionisation leicht verbessern, da durch die Senkung der Oberflächenspannung kleinere Tröpfchen entstehen können, so dass das gesteigerte Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu einer erhöhten Verdunstung des Lösemittels führt.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Kapillaren bei den Messungen ist ein direkter Vergleich sowohl zwischen den isopropanolhaltigen BGE mit unterschiedlichen pH-Werten, als auch mit wässrigen BGE (Tab. 7.2.3-1) schwer möglich, da der große Einfluss der Kapillarposition und des –schnitts erst bei der nachträglichen Datenauswertung deutlich wurden.

Auffällig sind die sehr hohen RSD%-Werte der Peakflächen, die nicht alleine auf der Zugabe von Isopropanol beruhen können. So wurden bei den Versuchen mit saurem BGE sehr starke Schwankungen des Trennstroms ($\pm 0.4 \mu\text{A}$) beobachtet, was zu einem unregelmäßigen EOF und verzerrten Peakformen geführt hat. Eine Ursache für diese Schwankungen wurde nicht entdeckt. Bei der Kapillare, die für die Messungen bei pH 8.5 verwendet wurde, tritt im Laufe der Messserien eine spontane, unerklärbare Steigerung der Peakflächen um bis zu 100% auf (0.02 mM Probe), deren Auslöser ein Kapillarriss sein könnte. Hinzu kommt, dass bei beiden pH-Werten nur wenige Elektropherogramme auswertbar waren.

Weitere Vergleiche von wässrigem und isopropanolhaltigem BGE werden in den folgenden Kapiteln beschrieben (Kap. 7.3.1 und 7.3.2).

7.2.5 Konzentrationsabhängigkeit von Peakfläche und Präzision (Linearität)

So lange die Tropfenoberfläche nicht durch zu hohe Analytkonzentrationen mit Analytmolekülen gesättigt ist, ist der ESI-Prozess ein konzentrationsabhängiger Vorgang. Die drei untersuchten Probenkonzentrationen sollten einerseits sicherstellen, dass bei allen Untersuchungen im linearen Bereich der Ionisation gearbeitet wurde, andererseits sollte bestimmt werden, ob die Präzision unterhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs stärker vom Rauschen oder von Integrationsfehlern beeinflusst wird.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	<i>pH 4.0</i>								
Kapillarposition	<i>C</i>								
Probenkonz. [mM]	<i>2.0</i>			<i>0.2</i>			<i>0.02</i>		
Neostigmin	1680000	16.0	102	334000	7.77	101	76600	20.8	100
Paracetamol	301000	18.7	99	46800	11.2	99	4110	13.1	100
Nikotinsäure	153000	14.0	34	19900	12.3	84	1690	21.0	69
Peakflächenverhältnis									
Paracet./Neostigm.	0.18	13.9	99	0.14	10.5	99	0.06	18.2	100
Nikotinsre./Neostigm.	0.09	12.8	34	0.06	12.6	84	0.02	11.0	69
BGE	<i>pH 8.5</i>								
Kapillarposition	<i>B</i>								
Probenkonz. [mM]	<i>2.0</i>			<i>0.2</i>					
Neostigmin	1200000	17.3	99	373000	9.71	100			
Paracetamol	237000	13.0	99	44500	15.4	100			
Nikotinsäure	147000	14.0	91	14900	15.8	100			
Peakflächenverhältnis									
Paracet./Neostigm.	0.20	13.8	99	0.12	7.80	100			
Nikotinsre./Neostigm.	0.12	14.4	91	0.04	8.37	100			

Tab. 7.2.5-1: Untersuchungen zur Linearität bei pH 4.0 und pH 8.5 mit unterschiedlichen Kapillarpositionen („C“ und „B“). Weitere Daten zur Linearität mit beiden BGE können aus Tabelle 7.2.3-1 abgelesen werden.

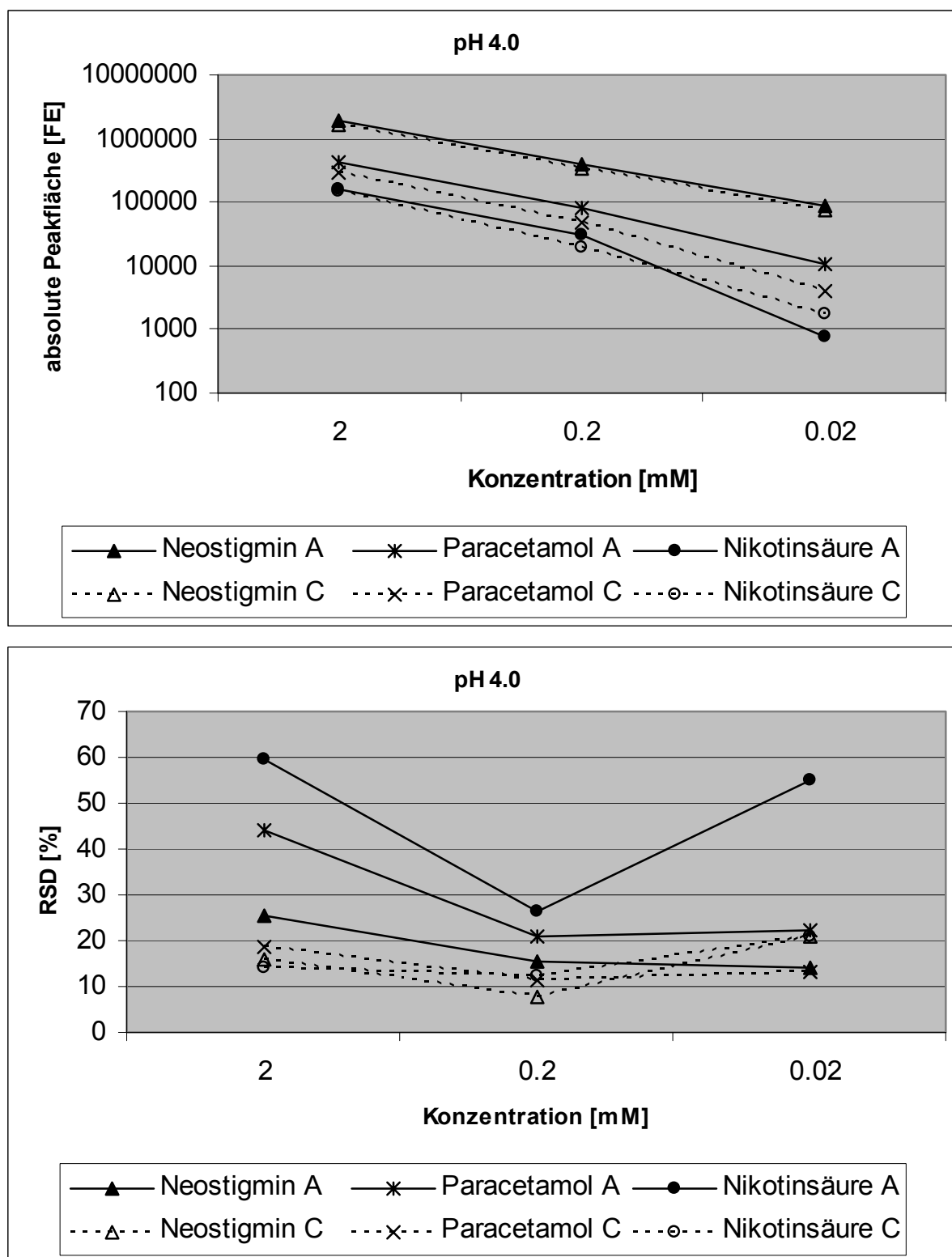


Abb. 7.2.5-1: Graphische Darstellung der absoluten Peakflächen (oben) und der dazugehörigen relativen Standardabweichungen (unten) der drei untersuchten Analyten bei pH 4.0 mit den Kapillarpositionen „A“ und „C“. Die durchgezogene Linie symbolisiert die Ergebnisse von Kapillare „A“, die gestrichelte die der Kapillare „C“ (Daten aus Tabelle 7.2.3-1; 7.2.5-1).

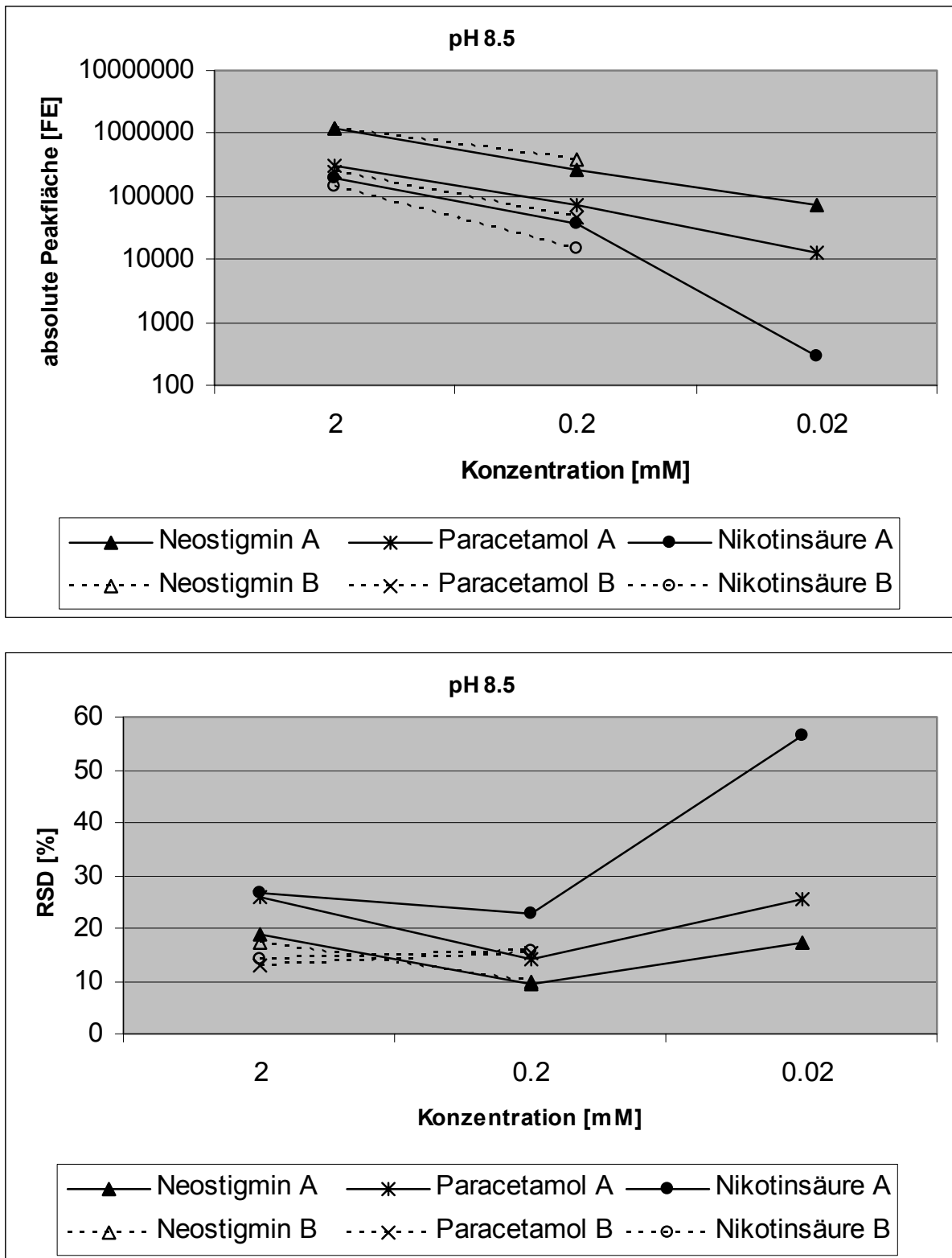
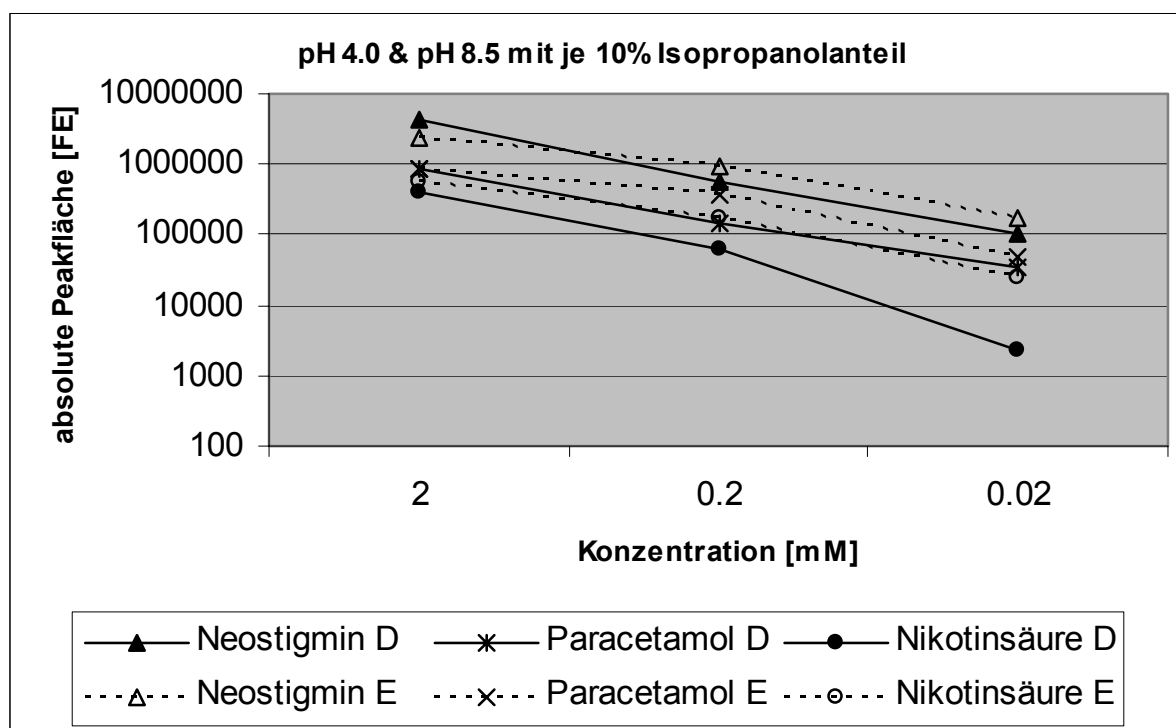


Abb. 7.2.5-2: Graphische Darstellung der absoluten Peakflächen (oben) und der dazugehörigen relativen Standardabweichungen (unten) der drei untersuchten Analyten bei pH 8.5 mit den Kapillarpositionen „A“ und „B“ (Daten aus Tab. 7.2.3-1; 7.2.5-1). Die durchgezogene Linie symbolisiert die Ergebnisse von Kapillare „A“, die gestrichelte die der Kapillare „B“.

Wie aus den Abbildungen 7.2.5-1 und 7.2.5-2 hervorgeht, wird bei allen Analyten im linearen Bereich der ESI gearbeitet, da die Steigung der Geraden bis zu einer Konzentration von 2.0 mM als konstant angesehen werden kann. Die RSD% liegen in den meisten Fällen um 20% (+/-10%), sind also für die ausgewählten Analyten über zwei Größenordnungen konstant. Ausnahmen sind die bereits diskutierten, außergewöhnlich hohen RSD%-Werte der Peakflächen aller Analyten bei pH 4.0 und einer Konzentration von 2.0 mM. Eine weitere Ausnahme bildet die hohe, pH-unabhängige, relative Standardabweichung des Nikotinsäurepeaks bei der niedrigsten Probenkonzentration mit Kapillarposition „A“. Wie bereits erwähnt, sind dort aus ungeklärten Gründen die Peakflächen signifikant kleiner und das Rauschen höher, was zu einem erhöhten Integrationsfehler führt, der seinen Ausdruck in einer erniedrigten Präzision findet. Diese Tendenz ist auch in geringerem Maße bei den anderen Kapillaren und BGE zu erkennen. Eine Teilverantwortung könnte die geringe Ionisierbarkeit der Nikotinsäure haben. Allerdings kann es sich hierbei nicht um den Hauptgrund für die Schwankungen handeln, da dieses Verhalten bei den anderen Kapillaren nicht so stark aufgetreten ist.



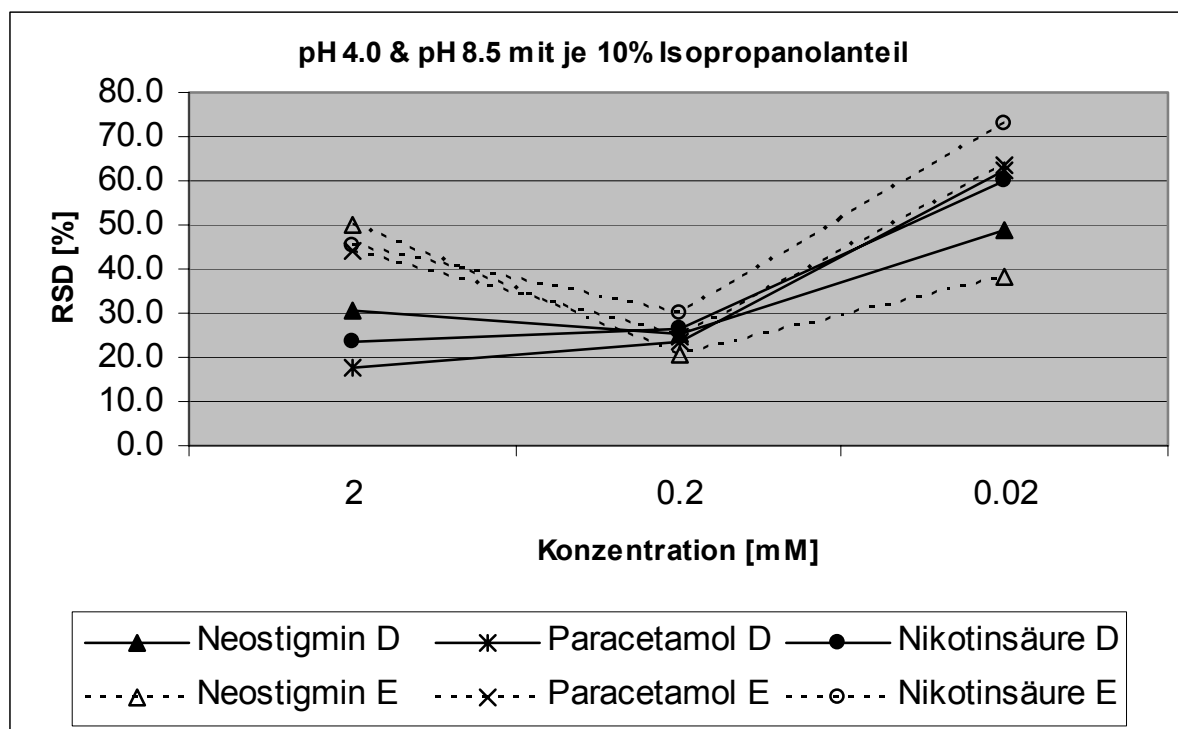


Abb. 7.2.5-3: Linearität kann auch bei isopropanolhaltigen BGE erkannt werden. Durchgezogene Linie: pH-Wert: 4.0, Kapillarposition „D“; gestrichelte Linie: pH-Wert: 8.5, Kapillarposition „E“ (vgl. Tab. 7.2.4-1). Die hohen RSD%-Werte bei einer Konzentration von 0.02 mM wurden bereits in Kapitel 7.2.4 erläutert.

7.2.6 Präzision der Peakflächen nach Teilung der Messreihen

Die resultierende Unsicherheit aus niedrigen Datenzahlen wurde bereits in Kapitel 5.2.1 diskutiert, wobei auf eine Mindestdatenanzahl von $n = 20$ für eine ausreichende Aussagekraft hingewiesen wurde. Exemplarisch sollen an zwei Messserien einerseits Unterschiede in der Präzision langer und kurzer Messserien, andererseits die Trends und Schwankungen der Peakflächen über längere Zeiträume gezeigt werden. Dazu werden die Messserien in fünf gleichgroße Abschnitte mit je 20 Trennungen eingeteilt und die RSD%-Werte der einzelnen Abschnitte bestimmt (Tab. 7.2.6-1; 7.2.6-2).

	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0											
Kapillarposition	C											
Probenkonz. [mM]	0.2											
Trennung	1-101		1-20		21-40		41-60		61-80		81-101	
Peakflächen von												
Neostigmin	7.48	101	9.25	20	7.48	20	4.00	20	4.93	20	8.92	21
Paracetamol	11.2	99	8.77	20	6.54	19	6.17	20	5.10	19	11.0	21
Nikotinsäure	12.3	84	9.46	20	8.77	19	7.51	20	6.85	6	13.5	19
Peakflächenverhältnis												
Paracet./Neostigm.	10.5	99	8.46	20	9.63	19	6.36	20	6.43	19	9.12	21
Nikotinsre./Neostigm.	12.6	84	11.2	20	12.5	19	9.59	20	9.55	6	13.5	19

Tab. 7.2.6-1: RSD% der Peakflächen und Peakflächenquotienten der in Abschnitte, bestehend aus je 20 Trennungen, aufgeteilten Messserie der 0.2 mM Probe (BGE pH 4.0; Kapillarposition „C“).

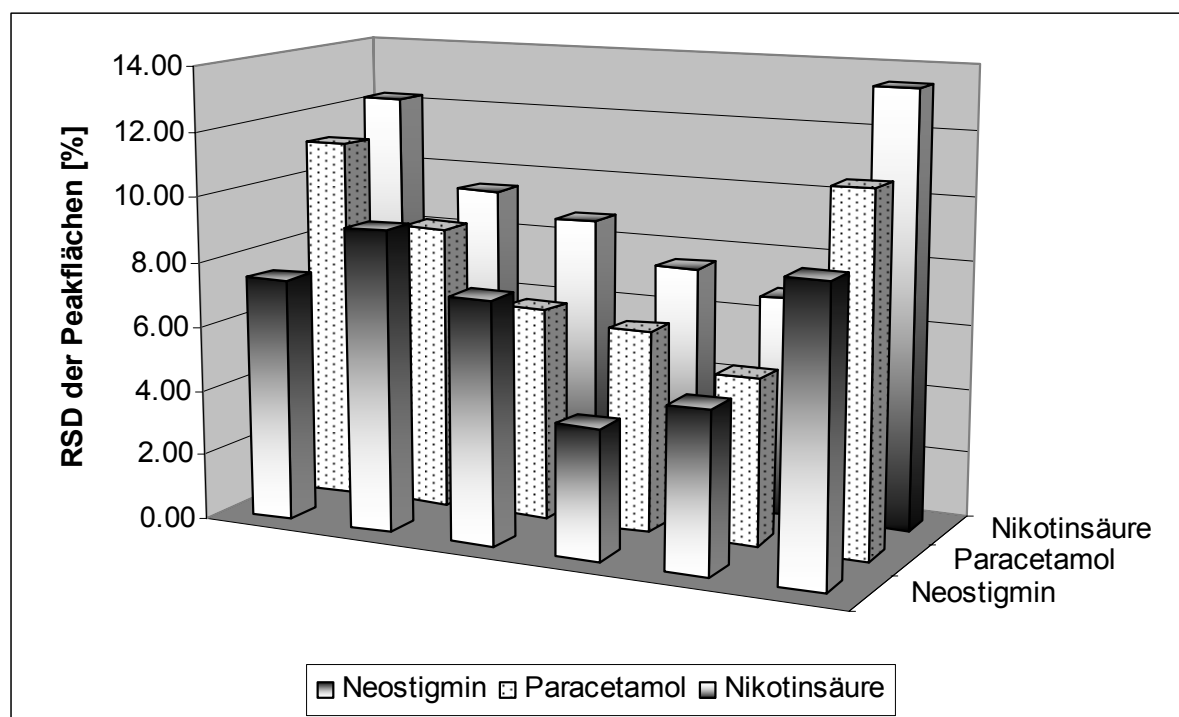


Abb. 7.2.6-1: Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 7.2.6-1. Die Säulen ganz links zeigen die RSD% aller 101 Trennungen an. Es folgen, analog zur Tabelle, die RSD%-Werte der fünf Teilabschnitte.

Wie an Abbildung 7.2.6-1 schnell abgelesen werden kann, liegen die RSD% der ersten vier Teilabschnitte unterhalb der Gesamt-RSD%. Dieses Ergebnis ist wenig überraschend, denn durch die geringere Datenzahl werden längerfristige Trends nicht erfasst. Die RSD%-Werte der Peakflächen sinken für die ersten 80 Trennungen

kontinuierlich. Im Vergleich zu den Trennungen 61-80 verdoppeln sich die Werte für die letzten 21 Trennungen allerdings wieder und beenden diese Tendenz.

Wie an den Werten der Peakflächenquotienten aus Tabelle 7.2.6-1 erkennbar ist, lassen sich diese Trends durch den Einsatz eines IS nur teilweise kompensieren beziehungsweise abmildern. Auffällig ist, dass in den Abschnitten, in denen die RSD%-Werte der absoluten Peakflächen unterhalb denen der Gesamt-RSD% liegen (Trennungen 21-80), die RSD% der absoluten Peakflächen durch die Quotientenbildung erhöht wird.

Ähnliche Resultate ergibt die Aufschlüsselung der ersten Messreihe der 0.2 mM Probe bei pH 8.5 und Kapillarposition „B“ in Tabelle 7.2.6-2 (Ursprung der Daten: Tabelle 7.2.1-1). Die Unterschiede liegen im geringen Ausmaß der RSD%-Erhöhung bei der Quotientenbildung und der Lokalisierung der hohen Schwankungen im ersten Abschnitt der Messreihe.

	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n
BGE	pH 8.5											
Kapillarposition	B											
Probenkonz. [mM]	0.2											
Trennung	1-100		1-21		21-40		41-60		61-80		81-100	
Peakflächen von												
Neostigmin	12.4	98	11.9	20	8.02	20	5.83	20	3.66	19	3.16	19
Paracetamol	13.1	98	15.2	20	6.51	20	4.77	20	4.43	19	4.30	19
Nikotinsäure	11.7	96	13.9	18	9.58	20	5.88	20	7.69	19	5.17	19
Peakflächenverhältnis												
Paracet./Neostigm.	6.59	98	9.39	20	6.95	20	6.78	20	3.85	19	4.92	19
Nikotinsre./Neostigm.	7.17	96	7.98	18	6.99	20	6.69	20	6.88	19	5.20	19

Tab. 7.2.6-2: Aufschlüsselung der kompletten Serie analog zu Tab. 7.2.6-1 (0.2 mM; BGE-pH-Wert: 8.5; Kapillarposition „B“).

Aus den teilweise großen Differenzen zwischen den RSD% der Abschnitte kann man schließen, dass es bei der Ionisation eine oder mehrere Ursachen für Variationen gibt, die sich über längere Zeiträume verändern. Durch die Verwendung von strukturfremden IS werden bei dieser Probe nur Varianzkomponenten kompensiert, die sich entweder außerhalb der Migrationszeitdifferenz von Neostigmin und Nikotinsäure verändern oder solche, die kurzfristig innerhalb dieser zeitlichen Differenz variieren und genauso schnell wieder auf den Ausgangszustand

zurückkehren. In Kapitel 7.3.5.2 werden mögliche Varianzursachen ausführlicher beschrieben.

7.2.7 Präzision von Migrationszeit und Mobilität

Bei der Verwendung von MS zur Detektion ist eine Identifikation der Peaks über die Migrationszeit durch das Zuordnen von Peaks aus Vergleichselektropherogrammen nicht notwendig. Von diesem Standpunkt aus gesehen ist eine hohe Reproduzierbarkeit der Migrationszeit sekundär. Die Kompensation einer niedrigen Trennleistung ist durch den Einsatz von EIE bis zu einem gewissen Grad möglich, wobei es zu einer Abnahme der Präzision durch die gegenseitige Beeinflussung der Analyten auf der Tröpfchenoberfläche kommen kann.

7.2.7.1 Einfluss der Kapillarposition auf die Präzision

	$t_{mig} [min]$	$RSD [\%]$	n	$t_{mig} [min]$	$RSD [\%]$	n
BGE	$pH\ 4.0$					
Kapillarposition	A			C		
Probenkonz. [mM]	0.2					
Neostigmin	8.29	2.81	58	8.06	2.76	101
Paracetamol	13.2	3.23	58	13.1	3.87	99
Nikotinsäure	15.6	3.24	58	15.1	3.48	84
Migrationszeitverhältnis						
Paracet./Neostigm.	1.59	0.69	58	1.63	1.33	99
Nikotinsre./Neostigm.	1.88	1.00	58	1.89	1.74	84
	$\mu_{eff,i} [m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}]$	$RSD [\%]$	n	$\mu_{eff,i} [m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}]$	$RSD [\%]$	n
Neostigmin	2.44E-05	2.42	58	2.60E-05	1.47	99
Paracetamol	4.11E-05	3.33	58	4.13E-05	3.85	99
Nikotinsäure	-6.27E-06	4.16	58	-5.81E-06	2.06	84

Tab. 7.2.7-1: RSD% der Migrationszeiten und effektiven Mobilitäten bei einer Analytkonzentration von 0.2 mM (BGE-pH-Wert: 4.0).

Der direkte Vergleich der Ergebnisse von Trennungen derselben Probe mit demselben BGE, aber auf verschiedenen Kapillaren, zeigt, dass weder die Migrationszeit und effektive Mobilität noch deren Präzisionen von der Position der Kapillare im Interface beeinflusst werden. Anders als bei den Peakflächen, deren Größe und Präzision von den Ionisierungsvorgängen im Interface abhängen, werden diese beiden Parameter hauptsächlich vom Zustand der Kapillaroberfläche bestimmt. Selbst Faktoren, die von der Kapillarposition abhängig sein könnten, wie

beispielsweise die Sogwirkung in der Kapillare durch sheath-flow und nebulizer gas, wirken sich nicht messbar auf die Präzision aus.

Wie bei den Peakflächen verbessert der Einsatz eines Internen Standards die Präzision. Beim Vergleich verschiedener Methoden sollten daher anstelle der Migrationszeiten die elektrophoretischen Mobilitäten verglichen werden. Zum Vergleich der Mobilitäten wird die Mobilität des EOF-Markers von der Gesamtmobilität des Analyten subtrahiert (Kap. 2.2.2; Abb. 2.2.2-2). Der EOF-Marker fungiert auf diese Weise als IS und Schwankungen des EOF werden rechnerisch ausgeglichen. Die RSD%-Werte in Tab. 7.2.7-1 liegen für die Migrationszeiten und die Mobilitäten im selben Bereich, so dass bei den gewählten pH-Werten von einem stabilen EOF ausgegangen werden kann und der Einsatz eines eigenen IS zur Verbesserung der Präzision Migrationszeiten nicht notwendig ist.

7.2.7.2 Einfluss von pH-Wert und Isopropanol auf die Präzision der Migrationszeit

	t_{mig} [min]	RSD [%]	n	t_{mig} [min]	RSD [%]	n
BGE	pH 8.5			pH 8.5; 10% Isopropanol		
Kapillarposition	B; 1.Serie			E		
Probenkonz. [mM]	0.2					
Neostigmin	4.65	1.57	98	8.02	2.71	90
Paracetamol	5.87	2.15	98	10.8	2.73	90
Nikotinsäure	8.94	2.05	96	18.5	3.57	89
Migrationszeitverhältnis						
Paracet./Neostigm.	1.26	0.64	98	1.34	0.99	90
Nikotinsre./Neostigm.	1.93	1.04	96	2.31	2.38	89
	$\mu_{eff,i}$ [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$]	RSD [%]	n	$\mu_{eff,i}$ [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$]	RSD [%]	n
Neostigmin	2.43E-05	1.33	98	1.72E-05	4.33	90
Paracetamol	9.23E-05	2.02	98	5.05E-05	2.72	90
Nikotinsäure	-3.19E-05	0.79	96	-2.11E-05	3.11	89

Tab. 7.2.7-2: Ergebnisse der Untersuchung derselben Probe, wie in Tabelle 7.2.7-1, mit BGE bei pH 8.5, sowie pH 8.5 und 10% Isopropanolanteil.

In alkalischem BGE sind die Migrationszeiten deutlich kürzer und die RSD%-Werte um etwa einen Prozentpunkt niedriger als bei pH 4.0. Ursache ist der viel stärker ausgeprägte und stabilere EOF bei pH 8.5. Bei der Zugabe von Isopropanol zum BGE erhöhen sich im Vergleich zu rein wässrigem BGE sowohl die Migrationszeiten (effektive Mobilitäten sinken), als auch die RSD%-Werte aufgrund des geringer ausgeprägten EOF ($\mu_{eo,pH\ 8.5}$: $9.23 \cdot 10^{-5} m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$; $\mu_{eo,pH\ 8.5, 10\% IPA}$: $5.05 \cdot 10^{-5} m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$).

Andererseits wird die Auflösung durch Isopropanol verbessert (Bsp. Auflösung Neostigmin – Paracetamol: $R_{pH\ 8.5}$: 5.83; $R_{pH\ 8.5, 10\% IPA}$: 17.4). Interessanterweise tritt bei den Trennungen in isopropanolhaltigem BGE in der Regel kein Tailing von Neostigmin auf. Offenbar reicht die geringe Menge Isopropanol aus, um die Wandinteraktionen des Neostigmins zu unterbinden [26, 102].

Im Gegensatz zu der großen Differenz der Präzisionen der Peakflächen zwischen wässrigem und isopropanolhaltigem BGE ist der Unterschied bei den Präzisionen der Migrationszeiten bei denselben Messserien nicht so groß. Daraus lässt sich schließen, dass der Zusatz von Isopropanol keine Auswirkung auf die Trennung der Analyten in der Kapillare hat, sondern nur auf die Ionisierungsvorgänge. Eine weitere Erklärung für die stark schwankenden RSD%-Werte der Peakflächen wäre daher nicht in der Zusammensetzung des BGE, sondern viel mehr in Position, Schnitt und Gesamtzustand der Kapillare zu suchen.

Bei den Untersuchungen wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Probenkonzentration und der Präzision der Migrationszeit beobachtet. Eine mögliche Ursache für die Variabilität könnte eine Überladung der Kapillare sein, die zu nicht symmetrischen Peaks mit schwankenden Migrationszeiten bei der Integration führt.

In Kapitel 7.2.3.1 wurde bereits angedacht, dass die Peakflächenpräzision unter anderem auch von der Elutionsgeschwindigkeit der Analyten aus der Kapillare abhängen könnte. Die Ergebnisse, gerade bei den BGE mit Isopropanol, zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen der Präzision der Peakflächen und der Präzision der Migrationszeit besteht. Die erwähnte Abhängigkeit würde sich daher ausschließlich auf die Elutionsgeschwindigkeit und nicht deren Stabilität beziehen.

7.3 Versuche mit isotoopenmarkiertem Internen Standard (Probe II)

Wie bereits erwähnt, sind isotoopenmarkierte Analoge des zu quantifizierenden Analytmoleküls die geeignetsten IS bei MS-Detektion. Beide Substanzen erreichen aufgrund ihrer fast gleichen Mobilität den Detektor zum gleichen Zeitpunkt, so dass selbst kurzfristige Schwankungen in der Ionisierung kompensiert werden können. In den folgenden Experimenten simulierte Paracetamol (PCM) den Analyten und d_4 -Paracetamol (d_4 -PCM) den dazugehörigen IS. Die Konzentration beider Substanzen betrug je 0.2 mg in 10 mL Wasser (entsprechend 0.132 mM Analyt und 0.129 mM IS). Sämtliche Versuche in diesem Kapitel wurden mit Kapillare „A“ durchgeführt, um die Auswirkungen einer veränderten Kapillarposition auf die Ergebnisse zu minimieren und einen direkten Vergleich mit den Paracetamolpeaks aus Probe I (0.2 mM, Kapillare „A“) zu ermöglichen.

Im Unterschied zu den Untersuchungen der Proben I und III – V wurde das Massenspektrometer im „scan-“ und nicht im empfindlicheren „SIM-Modus“ (Kap. 3.1.2) betrieben, da die Steuersoftware die Programmierung einer Methode zur gleichzeitigen Beobachtung simultan migrierender Substanzen im „SIM-Modus“ nicht zuließ. Im Vergleich zu den SIM-Messungen entstanden bei den Untersuchungen der Präzision dennoch keine Nachteile, da das höhere Rauschen des scan-Modus durch die Verwendung von EIE zur Integration eliminiert wurde.

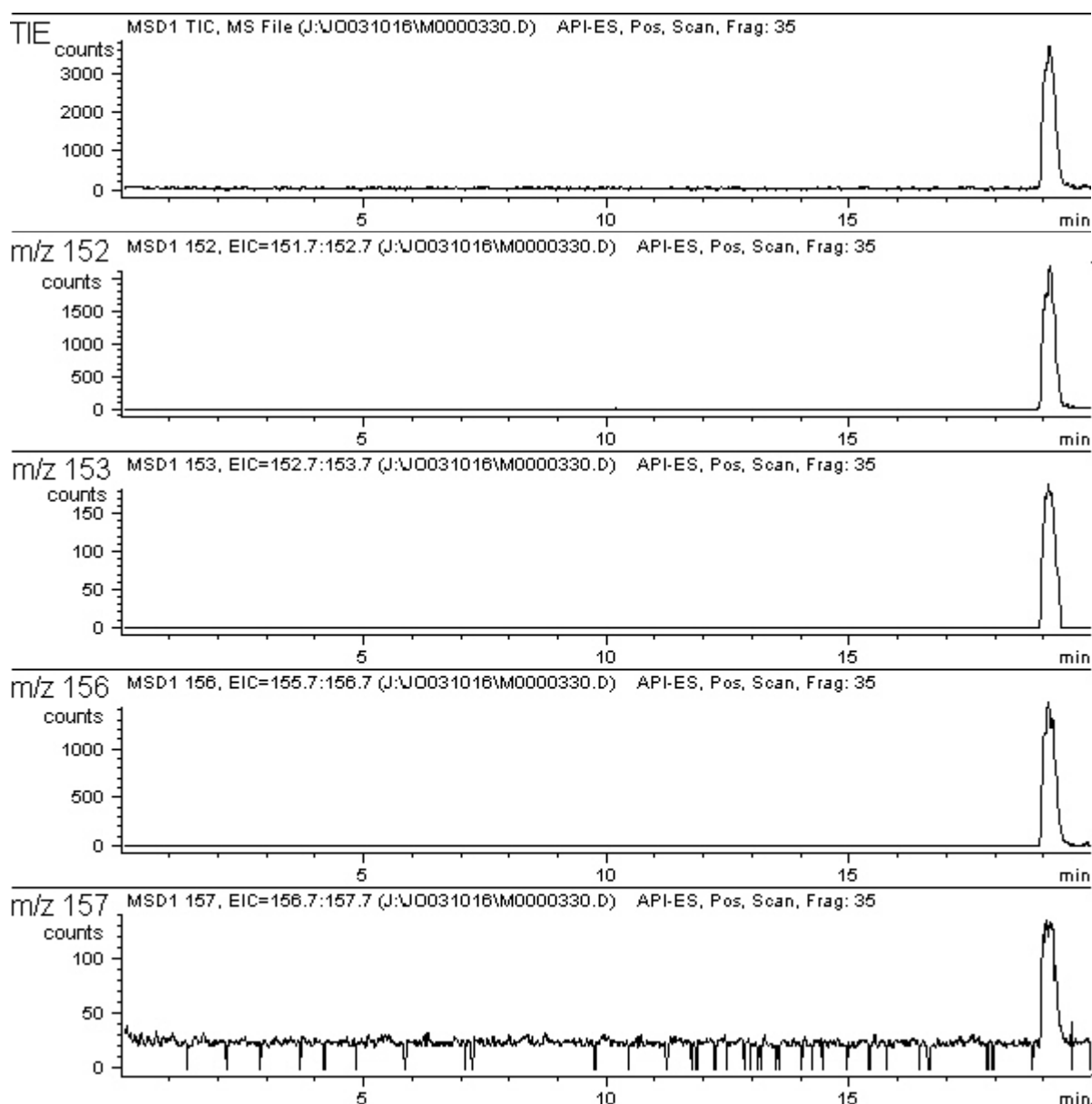


Abb. 7.3-1: TIE und die resultierenden vier EIE aller untersuchten Isotopomere des Paracetamols (BGE: pH 4.0 mit 10% Isopropanolzusatz; Position „A“).

In den Elektropherogrammen von ^{13}C -d₄-Paracetamol (m/z 157) sind zusätzlich zum Analytsignal kleine Störsignale und ein stärkeres Rauschen erkennbar (Abb. 7.3-1). Derartige Signale treten ausschließlich bei diesem Masse-Ladungs-Verhältnis auf und scheinen ihren Ursprung in der Elektronik des Massenspektrometers zu haben. Die Integration der Elektropherogramme bei m/z 157 könnte daher mit einem zusätzlichen, die Präzision senkenden Fehler behaftet sein.

Die Signalintensität ist bei massenspektrometrischer Detektion von mehreren Parametern abhängig. Primär ist das sheath liquid zu nennen, das aufgrund der höheren Flussrate die Effekte des BGE überwiegt [76]. Wie bereits im Kapitel zur Methodenentwicklung (Kap. 6.2.2) beschrieben, bestimmen seine Zusammensetzung (Art und Konzentration des organischen Lösemittels bzw. des Elektrolyten) und Flussrate die Ionisierungsausbeute. Obwohl bei allen Experimenten der sheath-flow gleich zusammengesetzt und dieselbe Flussrate eingestellt war, resultierten dennoch unterschiedlich große Peakflächen, so dass weitere Einflussgrößen auf die Signalintensität wahrscheinlich sind. Die Vermutung lag nahe, dass der BGE eine solche Einflussgröße sein könnte.

Bei pH-Senkung wird ein größerer Anteil der Analytmoleküle durch die erhöhte Konzentration an Hydroniumionen protoniert. Da die Peakfläche von Neostigmin ebenfalls von Änderungen des pH-Werts betroffen ist, muss es weitere Erklärungen für die beobachteten Tendenzen geben. Eine Möglichkeit ist die Adduktbildung von Acetationen mit Analytmolekülen. Bei einem niedrigeren pH-Wert liegen weniger Acetationen und mehr Essigsäuremoleküle vor, so dass die Tendenz des BGE ungeladene und damit undetektierbare Ionenpaare zu bilden, reduziert wird. Dagegen spricht, dass die Gesamtkonzentration an Essigsäure im sauren BGE höher ist, da der pH-Wert mit Essigsäure eingestellt wurde (Kap. 11.4). Wegen der Unsicherheit über die wahren Konzentrationsverhältnisse von Essigsäure und Acetat (Kap. 7.1.2) bei beiden untersuchten pH-Werten, ist eine genaue Aussage zum Ausmaß der Adduktbildung mit den Acetationen des BGE nicht möglich.

Weiterhin wird die Signalintensität von der Anwesenheit organischer Lösemittel beeinflusst (Kap. 3.1.1; 6.2.2 und 7.2.4).

7.3.1 Einfluss des Hintergrundelektrolyten auf die Peakfläche

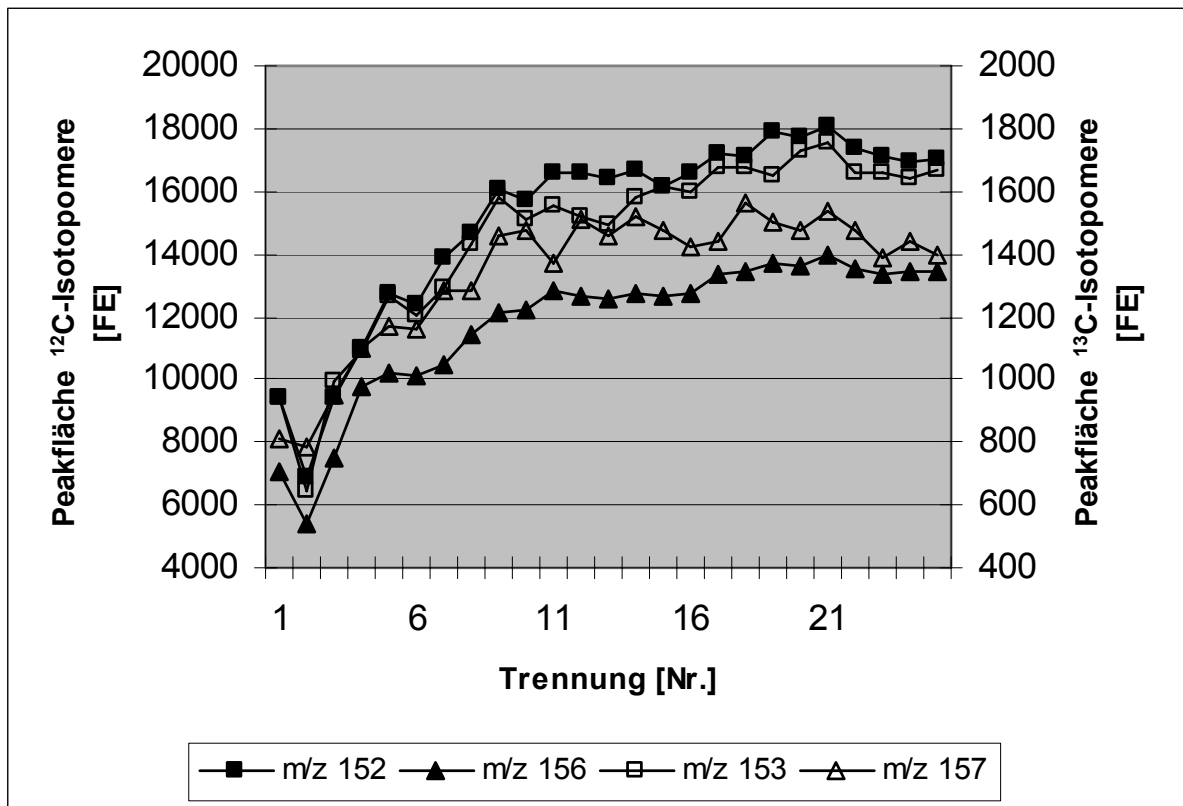


Abb. 7.3.1-1: 25 Aufeinander folgende Trennungen bei pH 8.5. Das Ansteigen der Peakflächen am Anfang ist nicht untypisch für den Gesamtverlauf und kann mit längerfristigen Variationen bei der Ionisierung begründet werden. Gefüllte Symbole stehen für ¹²C-Isotopomere, leere für ¹³C-Isotopomere.

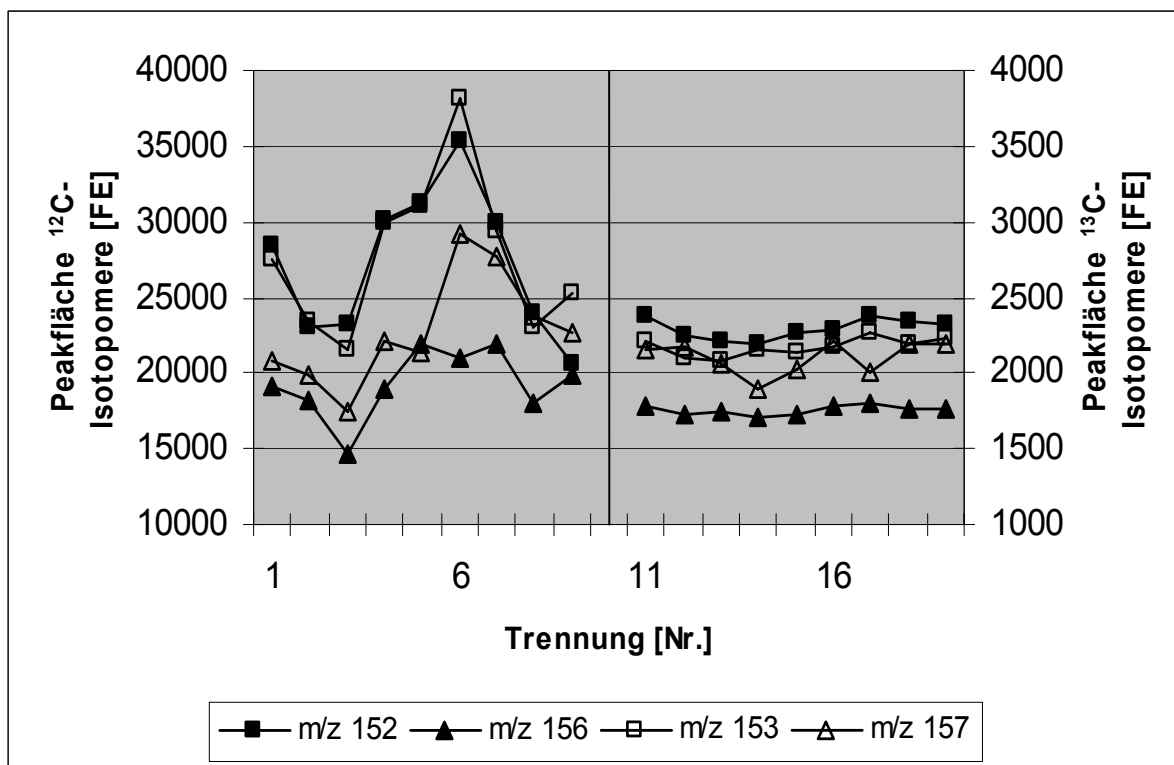


Abb. 7.3.1-2: Zwei Messserien bei pH 4.0. Die erste Serie beginnt bei Trennung 1, die zweite, die etwa acht Stunden später aufgenommen wurde, bei Trennung 11.

In Abbildung 7.3.1-1 (pH 8.5) und 7.3.1-2 (pH 4.0) werden die den Durchschnittswerten in Tabelle 7.3.1-1 zu Grunde liegenden Peakflächen dargestellt. Wie bereits in Kapitel 7.2.3.1 angedeutet, bestätigt die Auswertung der Daten von Probe II, dass die Ionisierung und damit die Größe der resultierenden Peakfläche vom pH-Wert des BGE abhängt (Tab. 7.3.1-1).

Im Gegensatz zu den in Kapitel 7.2.4 beschriebenen Experimenten ist bei den Versuchen mit Probe II eine direkte Beurteilung der Auswirkungen von Isopropanolzugabe zum BGE möglich, da alle Trennungen mit derselben Kapillare durchgeführt wurden. Bei Zugabe des organischen Lösemittels erhöhen sich die Peakflächen der Analyten (Tab. 7.3.1-1). Während sich die Peakflächen bei pH 8.5 fast verdoppelten, ist dieser Effekt bei pH 4.0 weniger stark ausgeprägt.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0			pH 4.0; 10% Isopropanol					
m/z 152	25100	16.2	18	33200	40.0	23	28500	15.0	17
m/z 153	2470	19.0	18	3360	39.0	23	2840	12.2	17
m/z 156	18400	9.82	18	24700	42.1	22	21000	13.1	16
m/z 157	2190	12.7	18	2260	46.8	23	1890	19.9	17
Gesamtfläche									
m/z 152+m/z 153	27570	16.3	18	36560	39.8	23	31340	14.2	17
m/z 156+m/z 157	20590	9.79	18	26960	42.5	22	22890	13.4	16
BGE	pH 8.5			pH 8.5; 10% Isopropanol					
m/z 152	15100	20.3	25	28500	23.5	24			
m/z 153	1460	19.6	25	2860	19.9	24			
m/z 156	11800	19.4	25	24100	9.43	19			
m/z 157	1340	16.5	25	2420	24.7	24			
Gesamtfläche									
m/z 152+m/z 153	16560	20.2	25	31360	23.2	24			
m/z 156+m/z 157	13140	19.0	25	26520	9.19	19			

Tab. 7.3.1-1: Die durchschnittlichen Peakflächen und relativen Standardabweichungen der vier untersuchten Isotopomere des Paracetamols. Bei allen Experimenten wurde Kapillarposition „A“ verwendet (vgl. Probe I Tab. 7.2.3-1). In den Ionen mit den Masse-Ladungs-Verhältnissen 152 und 156 liegen alle Kohlenstoffatome als ^{12}C vor, während die anderen beiden je ein ^{13}C -Isotop beinhalten. Die Werte im rechten Abschnitt der Spalte „pH 4.0; 10% Isopropanol“ sind die ausreißerbereinigten Daten der links daneben stehenden Messreihe.

Um die Auswirkung der BGE-Zusammensetzung auf die Peakflächen deutlicher zu machen, wurden die absoluten Werte aus Tab. 7.3.1-1 in die prozentualen Zu- oder Abnahmen umgerechnet (Tab 7.3.1-2).

Zuwachs an Migrationszeit	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Wechsel von	pH 8.5, wäss.	pH 8.5, IPA	pH 4.0, wäss.	pH 8.5, wäss.	pH 8.5, wäss.
auf	pH 4.0, wäss.	pH 4.0, IPA	pH 4.0, IPA	pH 8.5, IPA	pH 4.0, IPA
Durchschnitt aller Isotopomere	113	61.1	26.7	67.2	169
Zuwachs der Peakfläche	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Wechsel von	pH 8.5, wäss.	pH 8.5, IPA	pH 4.0, wäss.	pH 8.5, wäss.	pH 8.5, wäss.
auf	pH 4.0, wäss.	pH 4.0, IPA	pH 4.0, IPA	pH 8.5, IPA	pH 4.0, IPA
m/z 152 + 153 ¹⁾	66.5	-0.06	13.7	89.4	89.3
m/z 156 + 157 ¹⁾	56.7	-13.7	11.2	102	74.2
m/z 152 + 153 ²⁾	66.5	16.6	32.6	89.4	121
m/z 156 + 157 ²⁾	56.7	1.66	30.9	102	105

Tab. 7.3.1-2: Prozentualer Zuwachs der Migrationszeiten und Peakflächen bei Änderung der BGE-Zusammensetzung. ¹⁾ ausreißerbereinigter Datensatz; ²⁾ Original-Datensatz bei BGE pH 4.0; 10% Isopropanol

Aus Tabelle 7.3.1-2 lassen sich folgende Tendenzen ablesen: Sowohl durch Absenken des BGE-pH-Werts, als auch durch Zugabe von Isopropanol wird der EOF schwächer und die Migrationszeit verlängert sich. Ausgehend von BGE pH 8.5 wird der EOF stärker durch die Senkung des pH-Werts verlangsamt als durch die Zugabe von 10% Isopropanol. Das Ausmaß der EOF Senkung durch Isopropanol ist bei pH 8.5 stärker ausgeprägt als bei pH 4.0.

Die Auswirkungen von Änderungen der BGE-Zusammensetzung auf die Signalintensität verhalten sich umgekehrt, denn die Zugabe von Isopropanol erhöht die Peakfläche effektiver als die Absenkung des pH-Werts. Offenbar trägt die Senkung der Oberflächenspannung mehr zur Zunahme der Signalintensität bei als das erhöhte Angebot an Hydroniumionen. Die Zugabe von Isopropanol wirkt sich, wie auch bei der Reduktion des EOF, bei pH 8.5 stärker auf die Peakfläche aus als bei saurem BGE.

Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass der peakflächensteigernde Effekt mit der Elutionsgeschwindigkeit zusammenhängt. In diesem Zusammenhang sollte auch beachtet werden, dass bei dem BGE mit der geringsten EOF-Mobilität (pH 4.0; 10% Isopropanol) die höchsten Peakflächenwerte gemessen wurden. Das stützt die Theorie, dass die reduzierte Elutionsgeschwindigkeit ein dritter Faktor zur Erhöhung der Peakfläche sein könnte. Allerdings scheint die Elutionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Erhöhung der Flüchtigkeit nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Signalintensität wird also von einem additiven Effekt bestimmt. Dieser resultiert größtenteils aus den vorher genannten Gründen (erhöhte Konzentration an Hydroniumionen, Reduktion der Oberflächenspannung) und vermutlich zu einem kleinen Teil aus der durch Variation des BGE resultierenden Verlangsamung der Flussrate.

7.3.2 Einfluss des Hintergrundelektrolyten auf die Präzision der absoluten Peakflächen

Der Vergleich der RSD%-Werte mit dem F-Test (Tab. 7.3.2-1) ergibt, dass sich die Präzisionen der absoluten Peakflächen bei pH 4.0 und pH 8.5 nicht signifikant unterscheiden. Bei einem BGE-pH-Wert von 8.5 hat der Zusatz von Isopropanol ebenfalls keine Auswirkung auf die Präzision. Bei pH 4.0 liegen die RSD%-Werte bei Isopropanolzusatz deutlich über denen mit rein wässrigem BGE (Tab. 7.3.1-1).

Entfernt man aus den Daten der Messserie bei pH 4.0; 10% Isopropanol extreme Peakflächenwerte, sind dort ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Präzision mit dem F-Test feststellbar (Tab. 7.3.2-1).

Die Ursache der vom F-Test erkannten Unterschiede der Präzision bei „m/z 156“ und „d₄-PCM“ liegt in den geringen Schwankungen der Peakfläche von ¹²C-d₄-Paracetamol (m/z 156) bei BGE pH 8.5 mit 10% Isopropanol.

	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>	<i>T_F</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>U</i>
Vergleich von BGE mit	pH 4.0 & pH 8.5			pH 4.0 IPA & pH 8.5 IPA			pH 8.5 +/- IPA			pH 4.0 +/- IPA		
m/z 152	1.57	3.08	-	2.46	3.20	-	1.35	2.68	-	1.16	3.34	-
m/z 153	1.07	3.08	-	2.67	3.20	-	1.03	2.68	-	2.43	3.34	-
m/z 156	3.90	3.21	+	1.92	3.23	-	4.23	3.00	+	1.77	3.31	-
m/z 157	1.69	3.08	-	1.53	3.20	-	2.22	2.68	-	2.45	3.27	-
PCM	1.54	3.08	-	2.67	3.20	-	1.32	2.68	-	1.32	3.34	-
d ₄ -PCM	3.77	3.21	+	2.12	3.23	-	4.27	3.00	+	1.87	3.31	-

Tab. 7.3.2-1: Vergleich der RSD%-Werte der Messreihen aus Tab. 7.3.1-1 mit dem F-Test ($\alpha = 0.01$). Bei den RSD% des BGE pH 4.0; 10% Isopropanol wurde der ausreißerbereinigte Datensatz zu Grunde gelegt. „+“: es liegt ein Unterschied der Präzisionen vor; „-“ es liegt kein Unterschied vor.

7.3.3 Präzision der Peakflächen nach Teilung der Messreihen

In Tabelle 7.3.1-1 wurden bereits die Peakgrößen der einzelnen Isotopomere, die Peakfläche von Paracetamol und d₄-Paracetamol nach der Addition der ¹²C- und ¹³C-Isotopomere und deren Präzisionen im Zusammenhang mit den vier untersuchten BGE-Varianten vorgestellt. Dabei lagen die Präzisionen der absoluten Peakflächen im Bereich der Probe mit strukturfremden IS. Bei der Betrachtung der Abbildungen 7.3.1-1 (pH 8.5) und 7.3.1-2 (pH 4.0) wird deutlich, dass eine Aufteilung der Messreihen in Abschnitte teilweise höhere Präzisionen ergeben muss (Tab. 7.3.3-1).

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0								
Trennung	1-18			1-9			10-18		
m/z 152	25100	16.2	18	27400	17.7	9	22900	3.08	9
m/z 153	2470	19.0	18	2770	18.6	9	2170	2.81	9
m/z 156	18400	9.82	18	19300	11.8	9	17600	1.85	9
m/z 157	2190	12.7	18	2280	16.1	9	2100	5.29	9
m/z 152+m/z 153	27570	16.3	18	30170	17.7	9	25070	3.03	9
m/z 156+m/z 157	20590	9.79	18	21580	11.8	9	19700	1.98	9
BGE	pH 8.5								
Trennung	1-25			1-11			12-25		
m/z 152	15100	20.3	25	12600	24.9	11	17100	3.30	14
m/z 153	1460	19.6	25	1230	23.8	11	1600	4.49	14
m/z 156	11800	19.4	25	9940	23.8	11	13200	3.46	14
m/z 157	1340	16.5	25	1170	20.4	11	1470	3.52	14
m/z 152+m/z 153	16560	20.2	25	13830	24.8	11	18700	3.33	14
m/z 156+m/z 157	13140	19.0	25	11110	23.3	11	14670	3.18	14

Tab. 7.3.3-1: Präzisionen nach der Teilung der Messreihen.

Aus Tabelle 7.3.3-1 wird die Zusammensetzung der Gesamtpräzision der Messreihe aus einem Abschnitt mit hoher und einem mit niedriger Präzision erkennbar. Werden bei dem alkalischen BGE (pH 8.5) nur die Ergebnisse ab der zwölften Trennung zur Bestimmung der Präzision der absoluten Peakfläche verwendet, so ergeben sich bereits ohne Korrektur durch Quotientenbildung mit dem IS RSD%-Werte von 3.3% und 4.5%. Bei einem pH-Wert von 4.0 wurde durch die Auftrennung in zwei Teile eine RSD% von 1.9% und 3.0% erreicht. Betrachtet man die gesamte Messreihe, wird deutlich, wie stark die ersten neun Trennungen die Präzision beeinflussen (Abb. 7.3.1-2). Die beiden Messreihen liegen etwa acht Stunden auseinander, in denen offenbar eine Stabilisierung des Systems zu einer Verbesserung der Präzision geführt hat. Was genau die Stabilisierung hervorgerufen hat, ist derzeit noch nicht bekannt. Wären die Ursachen bekannt, könnten auch für längere Serien durch besser kontrollierte Ionisationsbedingungen höhere Präzisionen erreicht werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob bei den Versuchen mit strukturfremdem IS ebenfalls zeitweise eine so hohe Präzision erreicht wurde. Zur Beantwortung wurden die auf Kapillare „A“ untersuchten Messserien der 0.2 mM Probe in einzelne Datensätze zu je zehn Trennungen aufgeteilt und die RSD% der Peakfläche des Paracetamols bestimmt (Tab. 7.3.3-2).

	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0													
Kapillarposition	A													
Probenkonz. [mM]	0.2													
Trennung	1-58		1-10		11-20		21-30		31-40		41-50		51-60	
Paracetamol	21.1	58	22.3	7	17.5	10	6.94	10	29.4	9	28.5	9	8.24	10
BGE	pH 8.5													
Kapillarposition	A													
Probenkonz. [mM]	0.2													
Trennung	1-60		1-10		11-20		21-30		31-40		41-50		51-60	
Paracetamol	14.1	60	19.8	10	8.24	10	10.9	10	15.0	10	6.52	10	19.3	10

Tab. 7.3.3-2: Präzisionen der Paracetamolpeakfläche (0.2 mM) von Probe I. Beide Messreihen wurden in einzelne Datensätze unterteilt.

Die Präzision der einzelnen Abschnitte ist bei den in Tabelle 7.3.3-2 gezeigten Messserien unterschiedlich hoch. Die Abschnitte niedriger Präzision sind mit den Abschnitten niedriger Präzision aus Tabelle 7.3.3-1 vergleichbar. Lediglich in den Abschnitten erhöhter Präzision wurde bei Probe I nie ein mit Probe II vergleichbarer Wert erreicht. Die Ursache für die teilweise hohe Präzision in den Abschnitten der Messreihe bei isotopenmarkiertem IS ist zur Zeit noch unklar. Die RSD% der Peakflächen bei den kompletten Messreihen ist vergleichbar. Das lässt den Schluss zu, dass langfristig das Ausmaß von Variationsursachen auf die Analyten vergleichbar ist.

7.3.4 Konzentrationsabhängigkeit der Präzision

Wie bereits bei Probe I gezeigt, ist die Präzision bei CE-MS, in dem in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationsbereich, weniger von der Konzentration des Analyten, als von seiner individuellen Ionisierbarkeit abhängig. Bei der CE-UV haben S/N und der daraus resultierende Integrationsfehler eine weitaus höhere Bedeutung, denn unterhalb des LOD wird das Analytsignal stark vom Rauschen der Basislinie beeinflusst [91]. Bei CE mit MS-Detektion spielt dieser Faktor eine geringere Rolle, da bei der Verwendung des SIM-Modus oder durch die Nutzung von EIE auch bei geringen Analytkonzentrationen das chemische Rauschen der Basislinie reduziert wird. In den meisten Fällen ist das elektrische Rauschen ebenfalls so niedrig, dass es die Auswertung nicht beeinflusst (Ausnahme $^{13}\text{C-d}_4$ -Paracetamol).

Die Peakflächen der ^{13}C -Isotopomere sowohl von Paracetamol, als auch der deuterierten Variante, betragen ungefähr 1/10 von denen der Moleküle, die nur ^{12}C -Isotope enthalten. Bei einer aus der Herstellung bekannten Probenkonzentration von 20 $\mu\text{g/mL}$ ergibt sich daraus eine Konzentration der ^{12}C -Isotopomere von 18.2 $\mu\text{g/mL}$ (PCM: 0.121 mM / d_4 -PCM: 0.117 mM) und 1.8 $\mu\text{g/mL}$ (PCM: 0.0118 mM / d_4 -PCM: 0.115 mM) für die ^{13}C -Isotopomere. Trotz des Konzentrationsunterschieds von einer Größenordnung liegen die RSD%-Werte der Peakflächen im selben Bereich (Tab. 7.3.1-1), so dass wie bei Probe I keine Abhängigkeit der Präzision von der Konzentration im untersuchten Bereich erkennbar ist.

Die Präzision des Paracetamol- ^{13}C -Isotopomers (ca. 0.01 mM) ist höher, als bei der vergleichbar konzentrierten Nikotinsäure (0.02 mM) und liegt im Bereich des Paracetamolpeaks aus Probe I (0.02 mM) (Kap. 7.2.5). Bei einer Konzentration von 2.0 mM ist der Unterschied der Präzisionen von Paracetamol und Nikotinsäure nicht so ausgeprägt (Tab. 7.2.3-1). Das belegt die Aussage, dass das S/N und damit die erreichbare Präzision hauptsächlich von der individuellen Ionisierbarkeit des Analyten und weniger von seiner Konzentration bestimmt wird.

7.3.5 Präzision nach der Quotientenbildung mit dem Internen Standard

^{12}C - d_4 -Paracetamol (m/z 156) wurde als IS ausgewählt und die Peakflächen der übrigen Isotopomere auf die Peakfläche des IS bezogen. Zusätzlich wurde der Quotient aus den Gesamtpeakflächen von Paracetamol und d_4 -Paracetamol (jeweils die Summe aus ^{12}C - und ^{13}C -Isotopomer) berechnet, um einen möglichen Einfluss der Variation der ^{13}C -Isotopomere auf die Gesamtvariation zu erkennen.

	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0		pH 4.0; 10% IPA		pH 8.5		pH 8.5; 10% IPA			
m/z 152/156	10.9	18	15.5	22	15.7	16	3.17	25	8.22	19
m/z 153/156	11.8	18	16.1	22	15.1	16	3.70	25	7.18	19
m/z 157/156	8.14	18	12.8	22	13.1	16	7.48	25	5.63	19
PCM/ d_4 -PCM	10.6	18	14.9	22	15.0	16	3.15	25	6.25	19

Tab. 7.3.5-1: RSD% der Peakflächenquotienten der kompletten Messserien von Probe II (vgl. Tab. 7.3.1-1). Bei dem BGE (pH 4.0; 10% Isopropanol) wurden sowohl die Ergebnisse des Original- ($n = 22$), als auch des bearbeiteten Datensatzes ($n = 16$) angegeben.

Die Versuche mit isotopenmarkiertem IS bestätigen die Ergebnisse der Messserien mit strukturfremden IS (Probe I). Durch die Quotientenbildung mit dem IS verringert sich die RSD% der Peakflächen (in einigen Fällen wird sie halbiert). Die RSD% des Quotienten aus Paracetamol und d₄-Paracetamol sind unwesentlich geringer als der Quotient der Peakflächen von m/z 152 und m/z 156. Die Summierung der ¹²C- und ¹³C-Isotopomere wirkt sich nicht signifikant auf die Präzision aus, so dass es ausreicht, sich auf die Bestimmung der ¹²C-Isotopomere zu beschränken (Tab. 7.3.5-1).

Der Vergleich der Präzisionen der kompletten Serien von Probe II mit und ohne Isopropanolzusatz führte zu dem Ergebnis, dass die Zugabe des organischen Lösemittels die Präzision der Peakflächenquotienten vermindert. Diese Erkenntnis ist interessant, denn der F-Test erkennt beim Vergleich der RSD%-Werte der absoluten Peakflächen keine signifikanten Unterschiede bei der Variation der BGE (Tab. 7.3.2-1).

7.3.5.1 Alternative Berechnung des Quotienten

Im Verlauf der Auswertungen wurden verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung des Peakflächenquotienten untersucht, wobei sich das Teilen der einzelnen Analytpeakflächen durch die Peakfläche des IS als am praktikabelsten herausstellte. In einem Alternativverfahren wurden die Peakflächen der vier Isotopomere jeweils auf die Peakfläche des TIE bezogen. Bei den Versuchen mit Probe II wurde im „scan-Modus“ von m/z 150 – m/z 160 gearbeitet, so dass im TIE die Signale aller Masse-Ladungs-Verhältnisse in diesem Bereich in die Peakfläche eingehen. Dadurch ist die Peakfläche des TIE meist größer als die Peakfläche aus der Summe der Einzelpeaks, denn alle Ionen mit Masse-Ladungs-Verhältnissen von 150 bis 160 werden erfasst. Somit fließen bei der Verwendung der Peakfläche des TIE auch Schwankungen des chemischen Rauschens in die Bestimmung der Präzision mit ein. Die Ergebnisse liegen somit über denen des bisher verwendeten Verfahrens. So wurde mit dem Alternativverfahren z.B. eine RSD% von 5 – 6% für die gebildeten Peakflächenverhältnisse bei einem BGE mit pH 8.5 errechnet (zum Vergleich: Tab. 7.3.5-2: RSD% = 3.2%). Eine weitere untersuchte Variante der Berechnungen bestand im Teilen der aus den vier Analytpeaks summierten Gesamtpeakfläche

durch die jeweilige Einzelpeakfläche. Die resultierenden RSD% bei Quotientenbildung aus der Summe der Einzelpeaks lagen zwar unterhalb der des in dieser Arbeit angewendeten Verfahrens (pH 8.5: RSD% = 1 - 3%, Läufe 12-25: RSD%: bis zu 0.6%), da aber eine Summierung der Einzelpeaks gleichförmige und genau definierte Proben voraussetzt, ist eine solche Berechnung in der Praxis in den wenigsten Fällen einsetzbar.

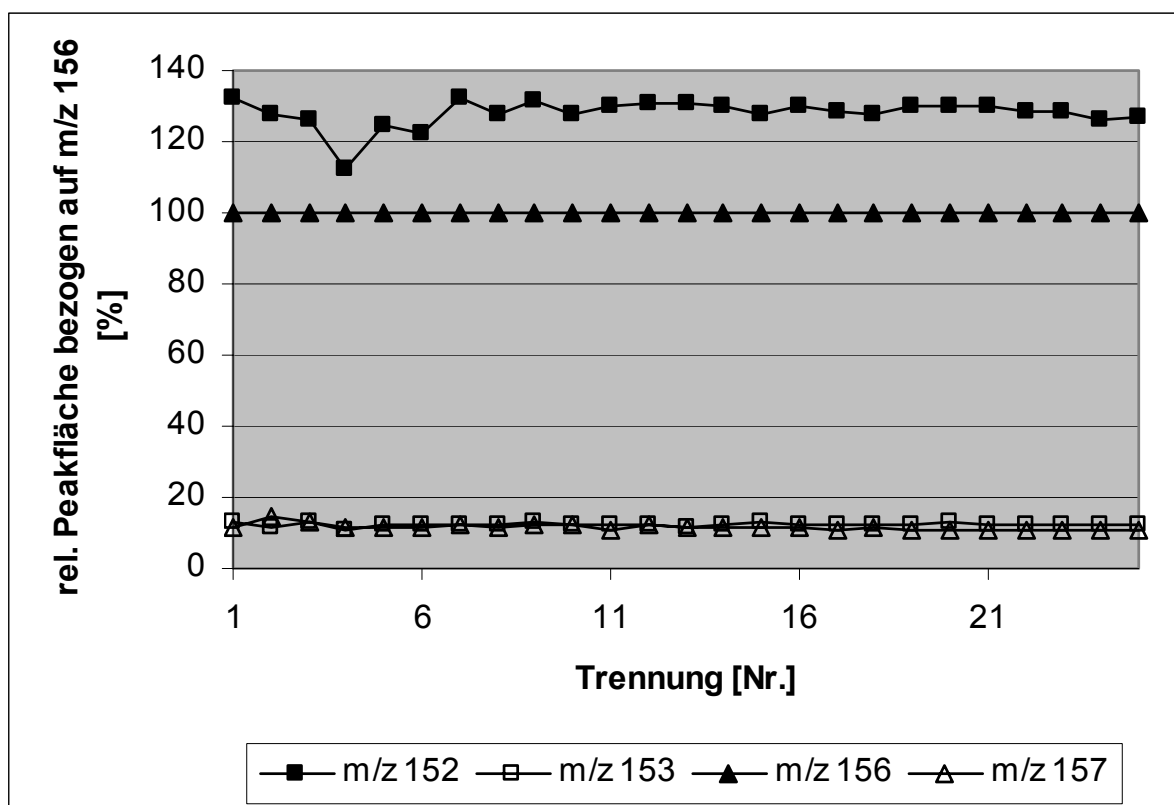


Abb. 7.3.5-1: Peakflächenquotienten aller untersuchten Paracetamolanaloga, bezogen auf die Peakfläche des ^{12}C - d_4 -Paracetamols bei pH 8.5. Wie an Abb. 7.3.1-1 erkennbar ist, betrifft die variierende Ionisationseffizienz zwischen den einzelnen Trennungen alle Isotopomere gleich stark. Daher bleiben die Werte der Peakflächenverhältnisse innerhalb enger Grenzen (vgl. Tab. 7.3.5-2). Gefüllte Symbole stehen für die ^{12}C -Isotopomere, leere für die ^{13}C -Isotopomere.

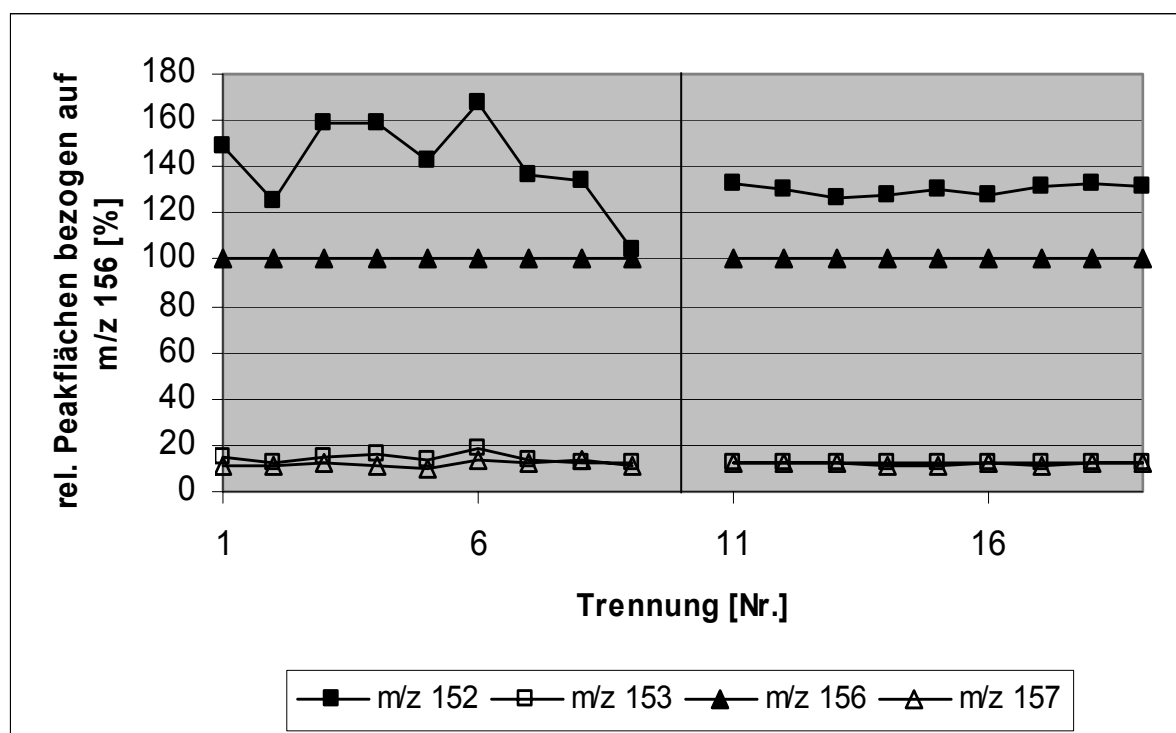


Abb. 7.3.5-2: Die aus Abb. 7.3.1-2 (pH 4.0) bekannten Daten als Quotienten der Peakflächen von Analyt und IS.

Bei dem Vergleich der Quotienten von Probe I und II mit dem F-Test wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% gewählt, da hier, ähnlich den Anforderungen beim Methodentransfer, ein kleiner β -Fehler (fälschliche Annahme der Nullhypothese: „es besteht kein Unterschied in der Präzision“) erwünscht ist (Kap. 5.2).

	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0						pH 8.5					
Trennung	1-58		31-40		21-30		1-60		51-60		41-50	
PCM/Neostig.	16.9	58	22.2	9	6.69	10	8.75	60	11.6	10	6.06	10
Trennung	1-18		1-9		10-18		1-25		1-11		12-25	
m/z 152/m/z 156	10.9	18	13.8	9	1.65	9	3.17	25	4.55	11	1.25	14
m/z 153/m/z 156	11.8	18	12.2	9	1.78	9	3.70	25	5.19	11	2.13	14
m/z 157/m/z 156	8.14	18	10.9	9	4.73	9	7.48	25	8.68	11	4.63	14
PCM/d ₄ -PCM	10.6	18	13.1	9	1.60	9	3.15	25	4.47	11	0.97	14
T _F	2.53		2.85		17.5		7.73		6.78		39.4	
T _{tab}	1.75		2.59		2.56		1.61		2.35		2.16	
sig. Unterschied	+		-		+		+		+		+	

Tab. 7.3.5-2: Vergleich der Peakflächenpräzisionen von 0.2 mM strukturfremden („PCM/Neostig.“) (oben) und isotopenmarkiertem („PCM/d₄-PCM“) Internen Standard (unten) mit dem F-Test ($\alpha = 0.1$) (Position: „A“). Die Tabelle ist folgendermaßen aufgeteilt: ganz links stehen die Gesamtpräzisionen der Serie, dann folgen die

Teilabschnitte mit den niedrigsten und den höchsten Präzisionen. T_F wurde aus den quadrierten RSD%-Werten von „PCM/Neostig.“ und „PCM/d₄-PCM“ gebildet. Der Vollständigkeit halber sind die Präzisionen der Quotienten der einzelnen Isotopomere und des IS ebenfalls enthalten. „+“: signifikanter Unterschied zwischen den RSD% festgestellt; „-“: kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Beim Vergleich der Präzisionen der Peakflächenquotienten aus Tabelle 7.2.3-1 mit denen aus Tabelle 7.3.5-1 mit Hilfe des F-Tests wird erkennbar, dass sich beide Quotienten trotz derselben Kapillarposition („A“) signifikant unterscheiden (Tab. 7.3.5-2). Die Verwendung eines isotopenmarkierten IS ermöglicht eine höhere Präzision als ein strukturfremder IS. Mit rein wässrigem BGE (pH 8.5) wurde eine RSD% von 3 – 4% über einen längeren Messzeitraum (n = 25; entspricht ca. einem halben Tag Messzeit) erreicht. Für einzelne Abschnitte der Messreihen lag die RSD% bei beiden wässrigen BGE zwischen 1 – 2% (Tab. 7.3.5-2).

An den Ergebnissen der Quotientenbildung bei pH 8.5 wird der Vorteil der Komigration von Analyt und deuteriertem IS deutlich. Obwohl der Gesamt-RSD%-Wert der absoluten Peakfläche des Paracetamols bei Probe I trotz höherer Datenzahl kleiner ist (Tab. 7.3.3-2; 14.1%), ergibt sich nach der Quotientenbildung beim isotopenmarkierten IS der niedrigere RSD%-Wert (Tab. 7.3.5-2; 3.2%). Das bedeutet, die Schwankungen in der Ionenquelle werden durch die extreme zeitliche Nähe von Analyt und IS effektiver ausgeglichen.

Die Abschnitte hoher Präzision (RSD% \approx 1%) aus der Messreihe mit isotopenmarkiertem IS legen den Gedanken nahe, die Gesamtpräzision der kompletten Messreihe sei nur wegen dieser „Ausreißerabschnitte“ höher, als die von Probe I.

Dem entgegengestellt sei der Vergleich der Präzision des Datensatzes mit der höchsten Präzision der Probe mit strukturfremdem IS (RSD% = 6.1, Tab. 7.3.5-2 pH 8.5, Trennung 41-50) und dem Teil mit der niedrigen Präzision von Probe II (RSD% = 4.5%, Tab. 7.3.5-2 pH 8.5, Trennung 1-11). Selbst bei einem Vergleich dieser „Extremwerte“ ändert sich die Aussage über die Qualitäten der unterschiedlichen IS nicht.

Die höhere Präzision bei den Versuchen mit isotopenmarkiertem IS kann nicht durch die geringere Datenzahl verursacht worden sein, da dieser Faktor bereits bei der Berechnung von F_{tab} berücksichtigt wird. In Tabelle 7.3.5-2 wurden zusätzlich noch die höchsten und niedrigsten Präzisionen bei annähernd gleicher Datenzahl

aufgenommen. Auch bei dem Vergleich dieser „Extremwerte“ ist ein signifikanter Unterschied der Präzisionen nachweisbar.

Auf einen Vergleich der Präzisionen von Probe I und II wurde bei isopropanolhaltigem BGE wegen der unterschiedlichen Kapillarpositionen bei den Messserien und der außergewöhnlich niedrigen Präzision von Probe I, die auf zusätzliche oder stärker ausgeprägte Varianzursachen schließen lässt, verzichtet.

7.3.5.2 Theoretische Überlegungen zu Variationsursachen Teil 1

Durch den IS wird eine Gruppe der Variationsursachen in der Ionenquelle kompensiert, die sich mit der Zeit ändern und durch den Migrationszeitabstand von Analyt und IS unterschiedlich gut erfassbar sind. Da sie durch einen IS kompensierbar sind, erhalten sie die Bezeichnung „K1“.

Mit isotopenmarkiertem IS können zeitlich bedingte Schwankungen vom Typ K1 in der Ionenquelle effektiver kompensiert werden als durch IS, die eine große Differenz in ihrer Migrationszeit aufweisen. Dennoch liegt die Präzision nicht im Bereich von UV-Messungen (Tab. 7.2.2-1). Das bedeutet, es existiert eine weitere Gruppe Varianzkomponenten bei der Ionisierung, die nicht zeitabhängig und daher nicht durch isotopenmarkierten IS auszugleichen sind. Diesen Varianzursachen wird die Bezeichnung „NK1“ für „nicht kompensierbar“ zugewiesen. Mögliche Komponenten dieser Art wären beispielsweise die individuelle Ionisierbarkeit der Moleküle, das Mischen des sheath-flow mit dem Fluss aus der Kapillare oder Schwankungen der Gasdrücke. Diese Gruppe von Varianzkomponenten beeinflusst die Substanzen von Probe I und II gleichermaßen, muss aber periodischen Fluktuationen unterliegen, denn anders wäre der Unterschied in der Präzision der Teilabschnitte von Probe II (Abb. 7.3.5-1, 7.3.5-2) nicht zu erklären.

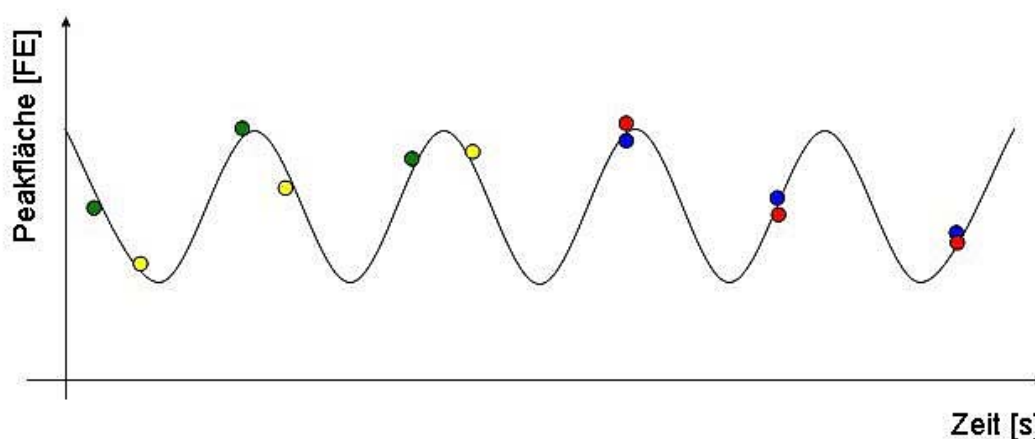


Abb. 7.3.5-3: Ausgleich von Ionisationsschwankungen vom Typ K1 bei strukturfremdem (gelbe und grüne Punkte als Peakflächenwerte) und isotopenmarkiertem (rote und blaue Punkte) IS durch die unterschiedliche Migrationszeitdifferenz. Bei der Quotientenbildung werden die Schwankungen von isotopenmarkierten IS effektiver ausgemittelt, da der Zeitpunkt der Peakflächenbestimmung näher beieinander liegt. Das letzte Pärchen des strukturfremden IS erklärt wie die abschnittsweise höheren Präzisionen aus Tabelle 7.3.5-2 zustande kommen. Die durchgezogene Linie symbolisiert die theoretischen Peakflächen als Resultat der zeitlichen Schwankungen der Ionisierungsbedingungen. In der Praxis sind die Amplituden der Schwankungen nicht so regelmäßig, wie in diesem Schema dargestellt. Die Punkte liegen nicht genau auf der theoretischen Linie, um die nicht durch IS kompensierbaren Varianzkomponenten auszudrücken.

7.3.6 Einfluss von Druck während der Trennung auf die Peakfläche und deren Präzision

Eine Möglichkeit die Mobilität der Analyten zu erhöhen und so die Analysenzeit zu reduzieren, ist das Anlegen von Druck an der Probeneinlassseite während der Trennung. Die Anwendung dieser Möglichkeit in der CE-MS haben HAU et al. [78] als erste beschrieben. Um den Einfluss von zusätzlichem Druck auf die Präzision abzuschätzen, wurden die Experimente mit isotopenmarkiertem IS bei 15 mbar Druck während der Trennung wiederholt (Ausnahme: BGE pH 4.0; 10% Isopropanol).

Ohne Druck entsprechen die Ergebnisse bezüglich der Migrationszeit denen von Probe I und II. Bei alkalischen BGE ist der EOF am stärksten und stabilsten, so dass sich die kürzesten Migrationzeiten und höchsten Präzisionen ergeben. Die Zugabe von Isopropanol senkt den EOF und seine Stabilität (Tab. 7.3.6-1).

Teilweise steigen (!) die Migrationszeiten durch das Druckanlegen. Außerdem ist die Präzision signifikant erhöht. Eine mögliche Ursache wäre, neben einer Fehlfunktion

des Drucksystems, eine verminderte Auswirkung des Drucks durch das „offene“ Ende der Kapillare oder der Sogwirkung von sheath-flow und nebulizer gas bei der Kopplung mit MS. Die RSD%-Werte der Migrationszeit sind niedriger, als die ohne Druck. Ob eine Stabilisierung des EOF oder/und die geringere Datenzahl für dieses Ergebnis verantwortlich ist/sind, kann nicht eindeutig beantwortet werden.

OHNE DRUCK BGE m/z 152 m/z 156 BGE m/z 152 m/z 156 MIT DRUCK BGE m/z 152 m/z 156	t_{mig}	$RSD\ [\%]$	n	t_{mig}	$RSD\ [\%]$	n	t_{mig}	$RSD\ [\%]$	n
	$pH\ 4.0$			$pH\ 4.0; 10\%\ IPA$					
	14.8	4.24	18	18.5	4.08	23	18.7	4.04	17
	14.8	4.16	18	18.5	4.06	22	18.7	4.07	16
	$pH\ 8.5$			$pH\ 8.5; 10\%\ IPA$					
	6.96	0.771	25	11.6	2.04	24			
	6.96	0.776	25	11.7	2.10	19			
	$pH\ 4.0$			$pH\ 8.5$		$pH\ 8.5; 10\%\ IPA$			
	15.6	2.77	9	6.96	0.435	10	11.8	0.373	10
15.6	2.70	9	6.96	0.444	10	11.8	0.404	8	

Tab. 7.3.6-1: Migrationszeiten und die entsprechenden RSD% bei den Versuchen ohne und mit Druck während der Trennung. Wegen der Vergleichbarkeit zu den Daten der ^{12}C -Isotopomere wurde auf die Angabe der ^{13}C -Daten verzichtet. Bei den Versuchen ohne Druck sind bei dem BGE (pH 4.0; 10% Isopropanol) sowohl der ursprüngliche, als auch der bereinigte Datensatz integriert.

Die Peakflächen und ihre Präzisionen sind im Vergleich zu den Ergebnissen aus Tabelle 7.3.1-1 erhöht. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus [78]. Dort werden die erhöhten Peakflächen und Präzisionen mit einem durch die erhöhte Flussrate stabilisierten Spray erklärt. Das Zutreffen dieser Erklärung bei den hier präsentierten Ergebnissen steht in Frage, denn da sich die Migrationszeiten nicht verkürzt haben, kann auch nicht von einem erhöhten Fluss aus der Kapillare ausgegangen werden. Außerdem würde eine Peakflächenvergrößerung aufgrund einer durch Druck erhöhten Flussrate der Erkenntnis der Erhöhung der Signalintensität durch Senkung des EOF widersprechen (Kap. 7.3.1). Gründe für die hohen Werte könnten die Kürze der Messserie und eine Phase erhöhter Ionisierungseffizienz im Interface (wie z.B. aus Tab. 7.3.1-1 erkennbar ist, schwankt die Ionisierungseffizienz in gewissen Zeiträumen) gewesen sein. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass bei den vorgestellten Versuchen der Zuwachs der Peakflächen durch die pH-Senkung stärker ausfiel als durch das Anlegen von Druck,

was bedeutet, dass die Senkung des EOF (und damit der Mobilität) einen stärkeren Einfluss auf die Signalintensität hat als die Mobilitätsänderung durch Druck.

Beim der Betrachtung der Tabellen 7.3.6-1 und 7.3.6-2 zeigt sich erneut, dass die Präzisionen von Peakflächen und Migrationszeiten nicht miteinander korrelieren und somit immer getrennt betrachtet werden sollten.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
	pH 4.0			pH 8.5			pH 8.5; 10% IPA		
BGE									
m/z 152	31600	10.1	9	17300	9.28	10	34600	9.73	10
m/z 153	3000	10.6	9	1690	8.94	10	3440	6.28	10
m/z 156	24200	9.44	9	13600	9.22	10	27100	7.63	8
m/z 157	2480	8.16	9	1480	2.91	10	2880	17.4	10
Gesamtfläche									
m/z 152+m/z 153	34600	10.1	9	18990	9.23	10	38040	9.31	10
m/z 156+m/z 157	26660	9.28	9	15080	8.18	10	29980	8.12	8
Peakflächenverhältnis									
m/z 152/m/z 156	1.31	2.27	9	1.27	0.93	10	1.32	4.47	8

Tab. 7.3.6-2: Absolute Peakflächen und die dazugehörenden RSD%-Werte der Untersuchungen mit isotopenmarkiertem IS bei 15 mbar Druck während der Trennung.

7.4 Versuche mit strukturverwandtem Internen Standard (Probe III)

7.4.1 Entwicklung der Probe

Für viele Substanzen ist ein isotoopenmarkierter IS kommerziell nicht erhältlich oder muss, um die nötige Isotoopenreinheit zu erreichen, aufwendig synthetisiert, gereinigt und charakterisiert werden. Zeit und Kosten könnten gespart werden, wenn es möglich wäre, bei quantitativen Bestimmungen isotoopenmarkierte IS durch leichter erhältliche IS zu ersetzen, ohne die Präzision zu senken.

Um zu untersuchen, in wie weit die Präzision von IS, die aufgrund ähnlicher Mobilitäten zeitnah zum Analyten ionisiert werden abhängt, wurde eine Probe mit zwei Analyten und zwei IS bestehend aus Neostigminbromid, Cetylpyridiniumchlorid, Atropinsulfat und Scopolaminhydrobromid zusammengestellt. Um den Einfluss kurzzeitiger Schwankungen der Ionisierungsbedingungen auf die Präzision abzuschätzen, enthält die Probe zwei Analyt-IS-Kombinationen, so dass gleichzeitig zwei mögliche Ursachen für Variationen mit einer Probe untersucht werden können. Neostigmin und Cetylpyridinium sollten als Permanentkationen neben dem zeitlichen Aspekt einen Vergleich der Reproduzierbarkeit des Transfers in die Gasphase ohne vorhergehende Ionisierungsreaktion ermöglichen. Die Tropanalkaloide Atropin und Scopolamin weisen eine ähnliche Molekülstruktur auf. Daher sind ähnliche Mobilitäten und Ionisierbarkeiten für beide Substanzen zu erwarten. Mit dieser Kombination kann daher neben dem Transfer in die Gasphase auch die Ionenbildung durch Protonierung untersucht werden.

Um das oberflächenaktive Cetylpyridinium besser in der Probelösung zu verteilen und die Auswirkungen unterschiedlicher organischer Lösemittel auf die Ionisierbarkeit der Proben zu untersuchen, wurden vier Proben hergestellt, denen je gleiche Volumenanteile Wasser, Acetonitril, Isopropanol oder Methanol zugesetzt wurde. Wie bei den Versuchen mit isotoopenmarkiertem IS sollte durch Anlegen von Druck während der elektrophoretischen Trennung die Analysenzeit verkürzt und eine mögliche Erhöhung der Präzision untersucht werden. Im Unterschied zu den Versuchen mit Probe II lagen hier die Drücke zwischen 0 und 25 mbar. Die Vergleichbarkeit zu den vorangegangenen Messreihen war gegeben, indem alle Trennläufe auf Kapillare „A“ durchgeführt wurden.

Bei keiner Trennung von Probe III wurde Cetylpyridinium detektiert. Die Ursache hierfür liegt in der Molekülstruktur dieses Analyten mit seinem positiv geladenen Pyridinring und der langen, unpolaren Alkylkette (Abb. 12-1). Wegen dieses Aufbaus werden Moleküle mit ähnlicher Struktur als Agens für eine dynamische Beschichtung der Kapillarinnenoberfläche, mit dem Ziel einer EOF-Senkung, einer EOF-Umkehr oder der Minimierung von Interaktionen anderer Analyten (z.B. Proteinen) mit der Kapillarwand, verwendet [20]. Dabei lagern sie sich mit dem kationischen Zentrum an die Silanolatgruppen der Kapillarwand an, so dass die Oberfläche nach außen neutral erscheint [103]. Anschließend lagern sich an die Alkylketten aufgrund unpolarer Wechselwirkungen (van der Waals-Kräfte) weitere Moleküle an, wobei das kationische Zentrum zum Kapillarinneren zeigt – von außen betrachtet, hat sich die Ladung der Kapillarwand umgekehrt, was einen Richtungswechsel des EOF zur Folge hat, wobei das Ausmaß der EOF-Änderung von der Konzentration des Agens abhängt. Es ist daher wahrscheinlich, dass das Cetylpyridinium der Probe an der Kapillarwand haften geblieben ist und somit nicht detektierbar war. Das ist auch der Grund für die nicht messbare Ionenunterdrückung, die sonst bei der ESI von oberflächenaktiven Molekülen zu beobachten ist. Das an der Wand haftende Cetylpyridinium hatte auf den EOF keine messbaren Auswirkungen, denn die Konzentration in der Probe war für eine vollständige Beschichtung der Kapillare zu gering. Während der Zusatz von Isopropanol zum BGE die Wandinteraktionen des Neostigmins effektiv unterdrückt (Kap. 7.2.7.2), ist die Konzentration des organischen Lösemittels nicht hoch genug, um bei Cetylpyridinium ähnlich wirksam zu sein [26, 102].

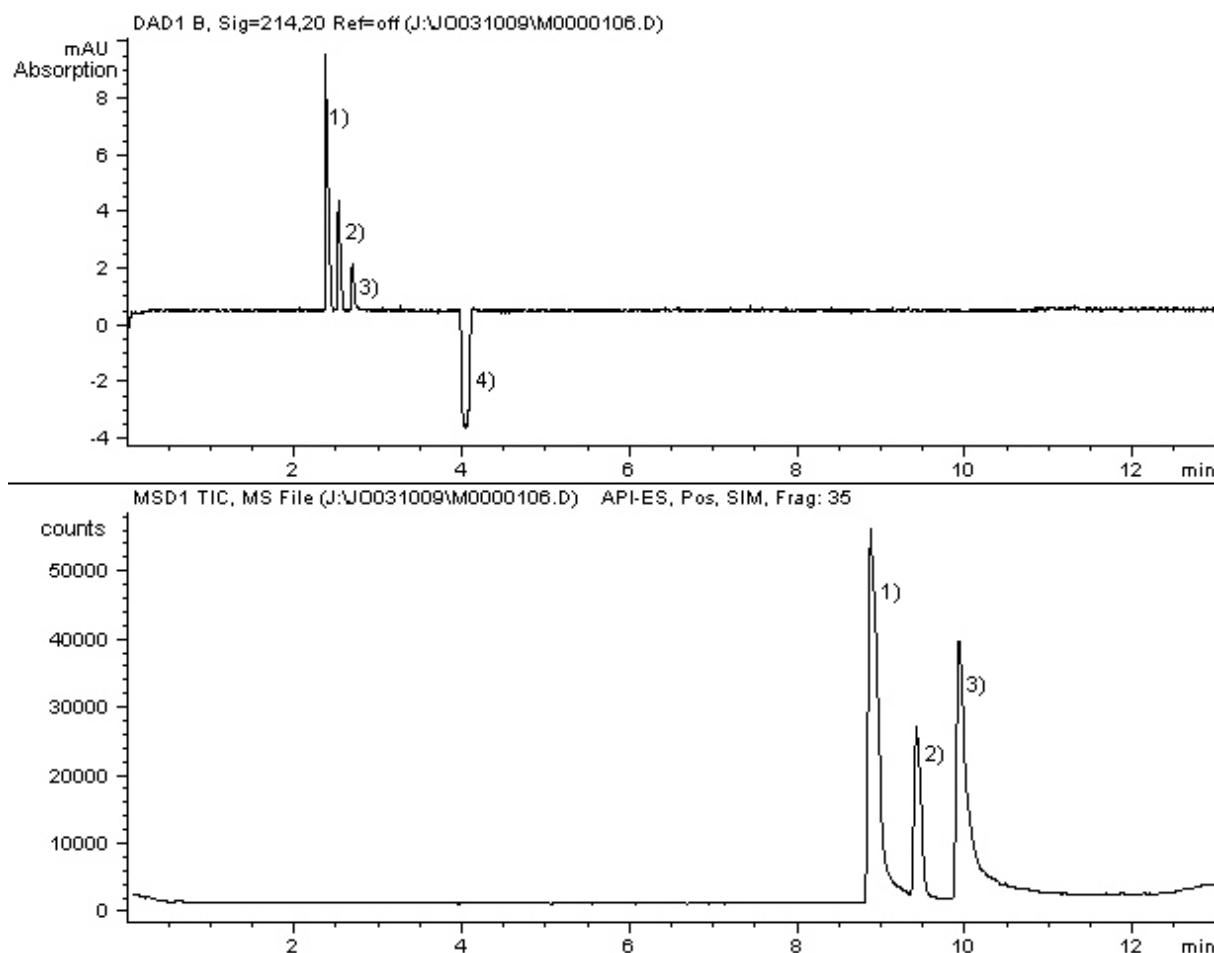


Abb. 7.4.1-1: Auftrennung der drei detektierbaren Analyten aus Probe III (BGE: pH 4.0) oben: UV-Detektion bei 214 nm; unten TIE der MS-Detektion. Die Zuordnung der Peaks erfolgte über EIE: 1): Neostigmin [m/z 223], 2): Atropin [m/z 290], 3): Scopolamin [m/z 302], 4) Das Lösemittel der Probe migriert als elektrolytarmer Zone mit dem EOF und weist eine geringere Absorption als der BGE auf.

Im Gegensatz zu den von MATEUS et al. veröffentlichten Messungen [104] war es bei Scopolamin nicht möglich die Peakform während der Trennung zu erhalten. Eine Ausnahme bilden die Trennungen mit BGE bei pH 4.0 ohne Isopropanolzusatz. Bei den drei anderen BGE-Varianten verbreiterte sich der Scopolaminpeak im Verlauf der Trennung so stark, dass ein Einsatz als Referenzpeak nicht möglich war (Abb. 7.4.1-2). Auf eine Methodenoptimierung wurde verzichtet, um die Vergleichbarkeit mit den vorangegangenen Messreihen aufrecht zu erhalten.

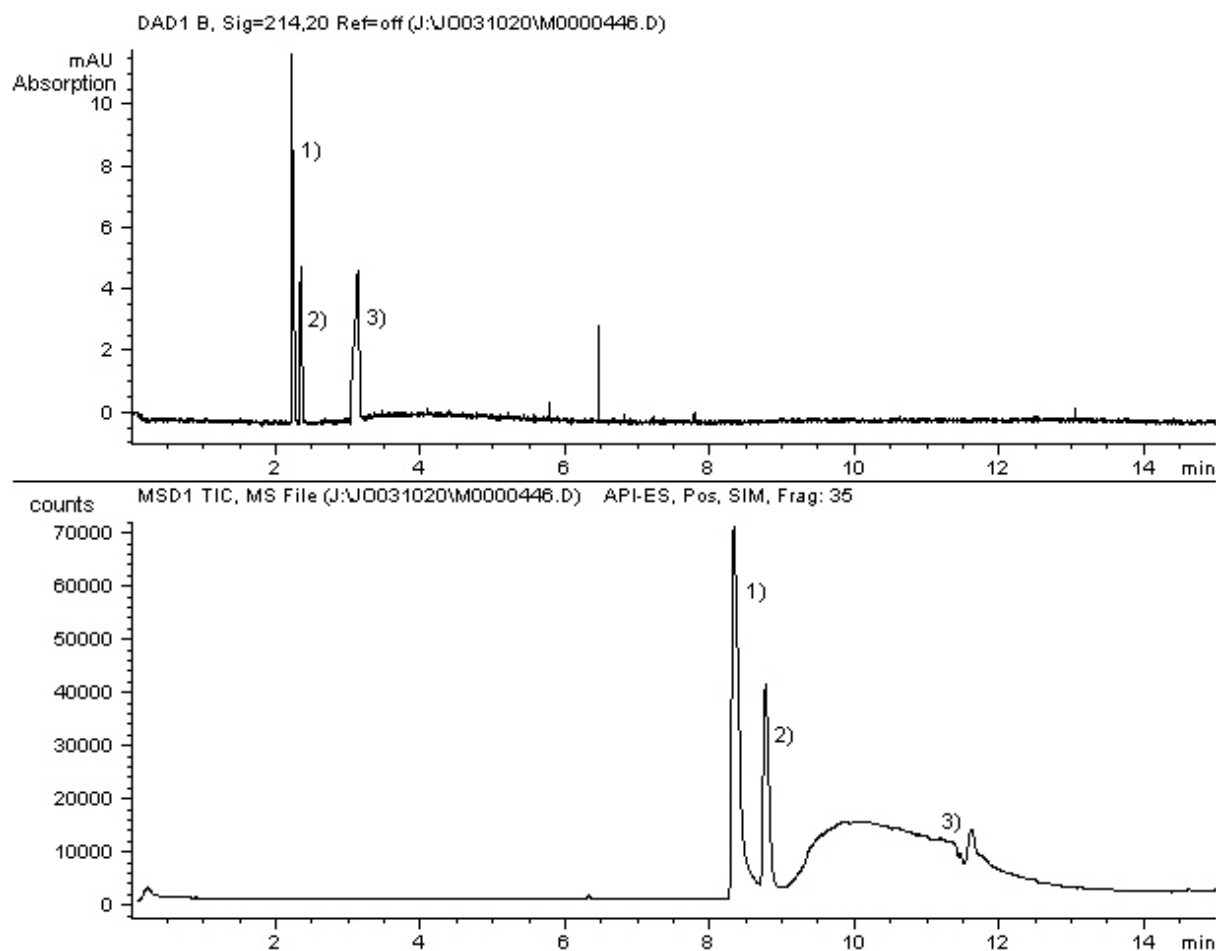


Abb. 7.4.1-2: Verlust der Trennleistung bei BGE pH 8.5 mit 10% Isopropanolzusatz. Während der Scopolaminpeak 3) bei UV-Detektion (214 nm) nach 3 min deutlich zu erkennen ist (oben), hat er sich im TIE auf 9 – 13 min verbreitert (unten). Die Zuordnung der Peaks entspricht Abbildung 7.4.1-1.

Da zwei der vier erwarteten Peaks in den Elektropherogrammen nicht nutzbar waren (Cetylpyridinium und Scopolamin), wurde das Auswertungsverfahren dahingehend verändert, dass Neostigmin aufgrund der bei Probe I beschriebenen Vorteile (Kap. 7.2.1) den IS für Atropin simuliert. Wie in Abbildung 7.4.1-1 und 7.4.1-2 erkennbar ist, migrieren die beiden Substanzen mit ca. 30 Sekunden Abstand, so dass die ursprüngliche Fragestellung des Einflusses der kurzzeitigen Ionisierungsschwankungen auf die Präzision trotz der Änderung bei der Auswertung untersucht werden konnte.

7.4.2 Zusammenfassung von Ergebnissen zur Erhöhung der Datenzahl

Wie beispielhaft für die BGE bei pH 8.5 und pH 4.0 mit 10% Isopropanolzusatz an Abb. 7.4.2-1 gezeigt, hat keines zu der Probe hinzugefügte organische Lösemittel

einen Effekt auf die absolute Peakfläche, der eindeutig der Lösemittelzugabe zugeordnet werden kann. So sind beispielsweise bei pH 4.0 alle Peakflächen ähnlich groß, während sie bei dem anderen BGE bei Zusatz von Isopropanol oder Methanol stark verkleinert sind.

Die Abbildung 7.4.2-1 zeigt auch die zeitlichen, nicht-lösemittelabhängigen Schwankungen der Ionisierungseffizienz. So betrifft z.B. die Verkleinerung der Peakflächen bei pH 4.0 sowohl den Atropinpeak als auch den Neostigminpeak. Einflüsse des BGE auf die Peakfläche sind wegen der niedrigen Datenzahl ($n = 5$) pro Lösemittelkombination nicht ablesbar, da sie von anderen Variationen überlagert werden. Dies wird bei dem BGE bei pH 8.5 mit 10% Isopropanol besonders deutlich, da hier die Peakflächen je nach Art des Lösemittels in der Probe größer oder kleiner sind als bei pH 4.0.

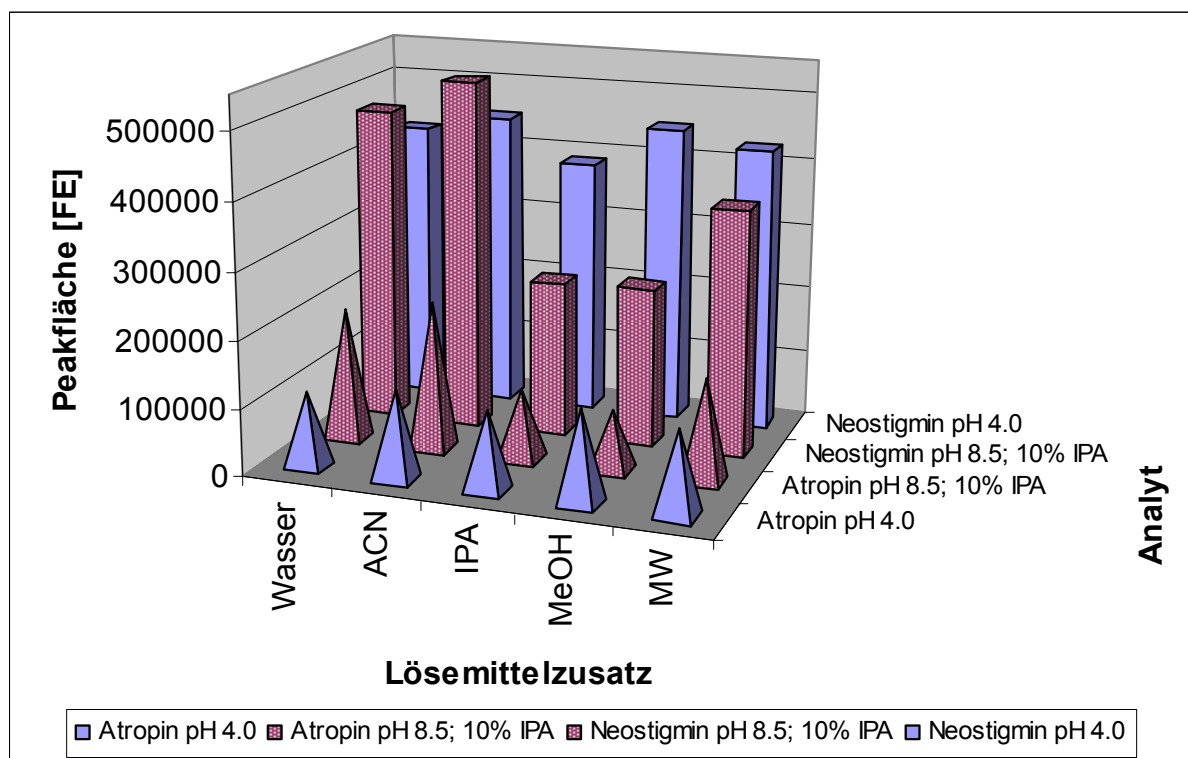


Abb. 7.4.2-1: Die absoluten Peakflächen der Analyten Atropin und Neostigmin sind vom Lösemittelzusatz zur Probe bei pH 8.5 bei 10% Isopropanolzugabe und 4.0 unabhängig. Lösemittel in der Probe: Wasser, Acetonitril (ACN), Isopropanol (IPA) oder Methanol (MeOH). MW: Mittelwert aller Peakflächen; Pyramiden: Peakflächen Atropin; Säule: Peakflächen Neostigmin

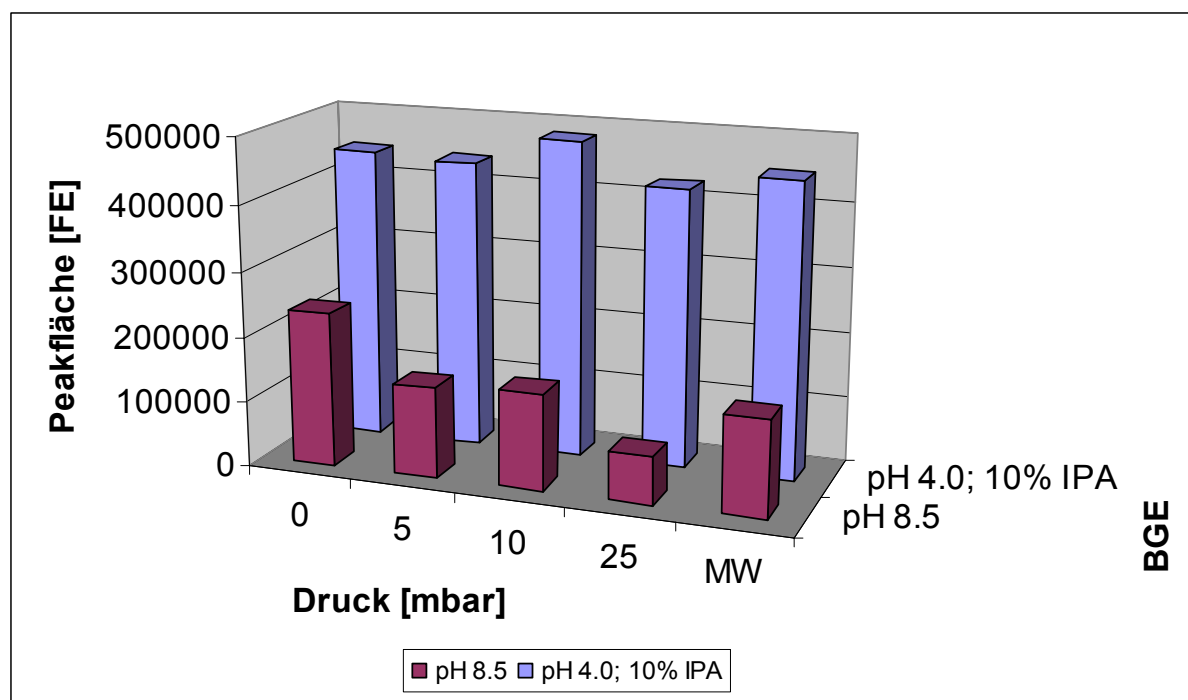


Abb. 7.4.2-2: Durchschnittliche Peakflächen des Neostigmins der rein wässrigen Probe bei BGE mit pH 8.5 und pH 4.0 mit 10% Isopropanolzusatz bei vier unterschiedlichen Drücken ($n = 5$). MW: Mittelwert

Anders als bei Probe II ist aus den in Abbildung 7.4.2-2 exemplarisch dargestellten Peakflächenwerten bei zwei unterschiedlichen BGE keine Korrelation zwischen angelegtem Druck und resultierender Peakfläche erkennbar.

Druck [mbar]	10	10	10	10	10	10	10	10	0	5	10	25
Lösemittel	Wasser	ACN	IPA	MeOH	Wasser	ACN	IPA	MeOH	ACN	ACN	ACN	ACN
BGE	pH 4.0				pH 4.0; 10% IPA				pH 4.0; 10% IPA			
Atro./Neost.	5.93	4.50	4.77	4.05	2.66	3.15	12.9	7.51	2.82	1.64	3.15	8.58
Scop./Neost.	14.8	12.5	12.0	17.5								
BGE	pH 8.5				pH 8.5; 10% IPA							
Atro./Neost.	4.24	2.02	19.7	10.7	10.5	1.90	6.37	4.30				

Tab. 7.4.2-1: Die Tabelle enthält die RSD%-Werte der Peakflächenquotienten aus Atropin (und Scopolamin bei BGE pH 4.0) und Neostigmin aus derselben Trennung ($n = 5$). Im linken Teil der Tabelle stehen die Ergebnisse bei konstantem Druck (10 mbar) und allen vier BGE. Im rechten Teil sind BGE (pH 4.0; 10% IPA) und Lösemittelzusatz (Acetonitril) zur Probe konstant, während der angelegte Druck steigt.

Die Präzisionen der Peakflächenquotienten sind sowohl von der Probenmatrix als auch vom Druck unabhängig (Tab. 7.4.2-1).

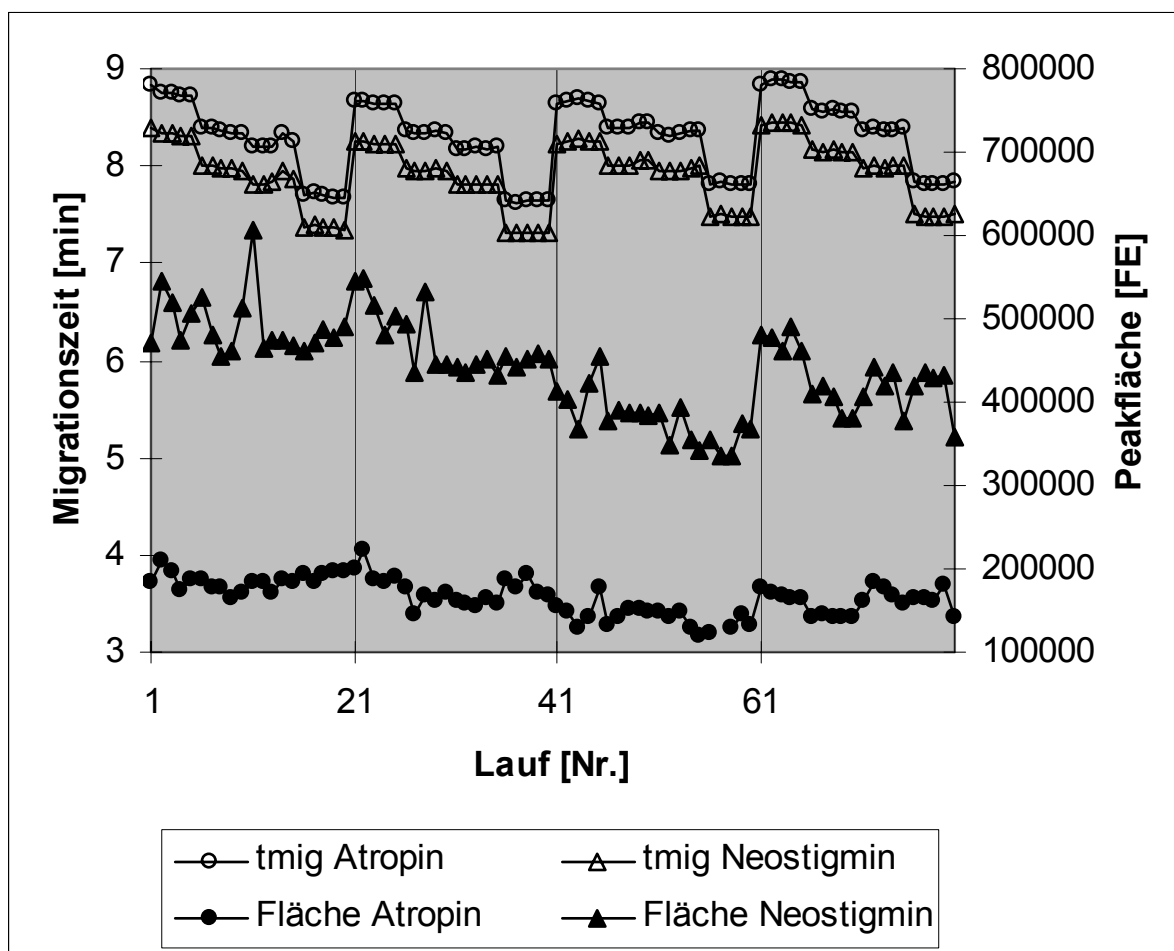


Abb. 7.4.2-3. Migrationszeiten (leere Symbole) und die dazugehörigen Peakflächen (gefüllte Symbole) von Probe III (BGE: pH 8.5; 10% Isopropanol). Lösemittelzusatz: Trennung 1 – 20: Wasser; Trennung 21 – 40: Acetonitril; Trennung 41 – 60: Isopropanol; Trennung 61 – 80: Methanol. Pro Lösemittelzusatz wurde jeweils bei fünf Trennungen ein Druck von 0, 5, 10 und 25 mbar angelegt, erkennbar an den sinkenden Migrationszeiten.

Bei der Betrachtung von Abbildung 7.4.2-3 ist im Vergleich zu den Versuchen aus Kapitel 7.3.6 eine Senkung der Migrationszeiten durch die Applikation von Druck (ca. 1.0 min bei 25 mbar) zu beobachten, während die Zugabe von organischem Lösemittel zur Probe keine Auswirkungen auf die Migrationszeit hat. Die sinkenden Peakflächen in den Abschnitten der Messreihe werden nicht von den variierenden Lösemittelzusätzen verursacht, da eine solche Tendenz bei den anderen BGE nicht vorhanden war (vgl. Abb. 7.4.2-1).

Fasst man die Ergebnisse der Abbildungen 7.4.2-1 bis 7.4.2-3 und Tabelle 7.4.2-1 zusammen, kann davon ausgegangen werden, dass die Parameter „Zusatz des organischen Lösemittels zur Probe“ und „Anlegen von Druck“ auf die absoluten

Peakflächen und die Präzision keine Auswirkungen haben. Sie sind daher bei den weiteren Beurteilungen der Präzision vernachlässigbar, so dass es möglich ist, die Daten der unterschiedlichen Messreihen zusammenzufassen und gemeinsam auszuwerten. Da dadurch die Datenzahl steigt, wird die Aussagekraft der Ergebnisse verstärkt.

7.4.3 Einfluss von Hintergrundelektrolyt und Druck während der Trennung auf die Peakflächen

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0			pH 4.0; 10% IPA		
Neostigmin	465000	10.5	80	422000	10.2	80
Atropin	175000	11.2	80	124000	13.0	80
Scopolamin	337000	14.8	80			
Peakflächenverhältnis						
Atropin/Neostigmin	0.38	4.12	80	0.29	13.9	80
Scopolamin/Neostigmin	0.73	10.3	80			
BGE	pH 8.5			pH 8.5; 10% IPA		
Neostigmin	320000	43.5	80	442000	5.47	80
Atropin	136000	50.8	80	165000	5.65	80
Peakflächenverhältnis						
Atropin/Neostigmin	0.41	12.4	80	0.37	4.02	80

Tab. 7.4.3-1: Gepoolte absolute Peakflächen und deren RSD%-Werte sowie die RSD%-Werte der Peakflächenquotienten nach Verwendung von Neostigmin als Internen Standard (Kapillarposition „A“). Die Ursache für die hohen RSD%-Werte bei pH 8.5 war nicht zu ermitteln.

Über den Einfluss der BGE-Zusammensetzung und des Drucks auf die Größe der Peakflächen lässt sich bei Probe III eine andere Aussage als bei den Proben I und II treffen. Im Unterschied zu den übrigen Proben resultieren die größten Peakflächen bei pH 4.0. Die Zugabe von Isopropanol erhöht bei pH 4.0 die Peakflächen nicht. Wahrscheinlich handelt es sich um ein zufälliges Ergebnis, da diese Beobachtung ausschließlich bei Probe III gemacht wurde.

Die Peakfläche bleibt bei Versuchen mit Probe III trotz der durch Druck verkürzten Migrationszeit unverändert (Abb. 7.4.2-3). Wie schon bei den Experimenten vorher, widersprechen diese Ergebnisse denen von HAU [78].

7.4.4 Präzision mit strukturverwandtem Internen Standard und Vergleich mit den Ergebnissen von Probe I und II

Tabelle 7.4.3-1 enthält Daten, die durch Poolen aus den Ergebnissen der Experimente mit unterschiedlichem Lösemittelzusatz zur Probe und variierendem Druck erzeugt wurden. Diese gepoolten Datensätze bilden die Grundlage für die folgenden Aussagen zur Präzision mit strukturverwandtem IS.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Proben I und II kann trotz der außergewöhnlich niedrigen Präzision von Probe III bei pH 8.5 von einer pH-Unabhängigkeit der Peakflächenpräzision ausgegangen werden. Die Präzision der absoluten Peakfläche ist ebenfalls unabhängig von der Zugabe von Isopropanol (Tab. 7.4.3-1). Die Unterschiede zu den RSD%-Werten von Neostigmin aus Probe I (Tab. 7.2.4-1) bei Verwendung isopropanolhaltiger BGE kann unter anderem auf die Kapillarpositionen zurückgeführt werden.

Der direkte Vergleich der RSD%-Werte der absoluten Peakflächen des Neostigmins in den Tabellen 7.4.3-1 und 7.2.3-1 (0.2 mM Probe) ergibt bei pH 4.0 ähnliche Beträge. Bei pH 8.5 ist der Vergleich wegen der hohen RSD%-Werte von Probe III nicht sinnvoll. Interessant ist, dass sich bei pH 8.5 nach der Quotientenbildung ein RSD%-Wert ergibt, der im Rahmen der übrigen RSD%-Werte liegt. Daraus kann man schließen, dass bei beiden Substanzen ähnliche Ionisierungsbedingungen vorlagen. Mit einem Unterschied in der Migrationszeit von 30 Sekunden können also die Variationsursachen vom Typ K1 bereits effektiv kompensiert werden.

Die RSD%-Werte der absoluten Peakflächen aus den Untersuchungen mit isotopenmarkierten IS (Tab. 7.3.1-1) liegen etwas über denen der Probe III, wobei die unterschiedlichen Ionisierbarkeiten der betrachteten Analyten den direkten Vergleich erschweren, da Paracetamol schwerer zu ionisieren ist (vgl. unterschiedliche RSD%-Werte bei Probe I in Tab. 7.2.3-1 und 7.2.5-1).

Bei der Betrachtung der kurzen Messreihen von Probe II wird der Vorteil isotopenmarkierter IS erkennbar. Die RSD% der Peakflächenquotienten des zweiten Abschnitts bei pH 4.0 mit Probe II liegt bei 1.6% ($n = 9$) (Tab. 7.3.5-2). Zum Vergleich: die RSD% der Quotienten bei demselben BGE pH-Wert aus Tabelle

7.4.2-1 liegen bei $n = 5$ zwischen 4% und 5%. Auch bei den in der Tabelle nicht gezeigten Drücken liegen die RSD% auf der Grundlage gleicher Datenzahlen zwischen 2 und 9%. Sie sind damit höher als bei Probe II. Vereinzelt, ähnlich niedrige RSD% können mit der geringeren Datenzahl dieser Serien und kurzfristigen Verbesserungen der Ionisierungsbedingungen (NK1) erklärt werden.

Bei langfristigen Messungen ist das Ergebnis umgekehrt: die Präzision der Peakflächenquotienten ist mit strukturverwandtem IS bei BGE mit pH 4.0 und pH 8.5 mit 10%iger Isopropanolzugabe höher als bei isotopenmarkierten IS (Tab. 7.4.3-1 RSD% ca. 4%; Tab. 7.3.5-1 RSD% ca. 11%, bzw. 6%). Bei pH 4.0 mit 10% Isopropanolzusatz ergeben sich bei beiden IS ähnliche Präzisionen, während die bei pH 8.5 erhaltenen Daten aufgrund der hohen RSD%-Werte von Probe III nicht verglichen wurden.

7.4.5 Theoretische Überlegungen zu Variationsursachen Teil 2

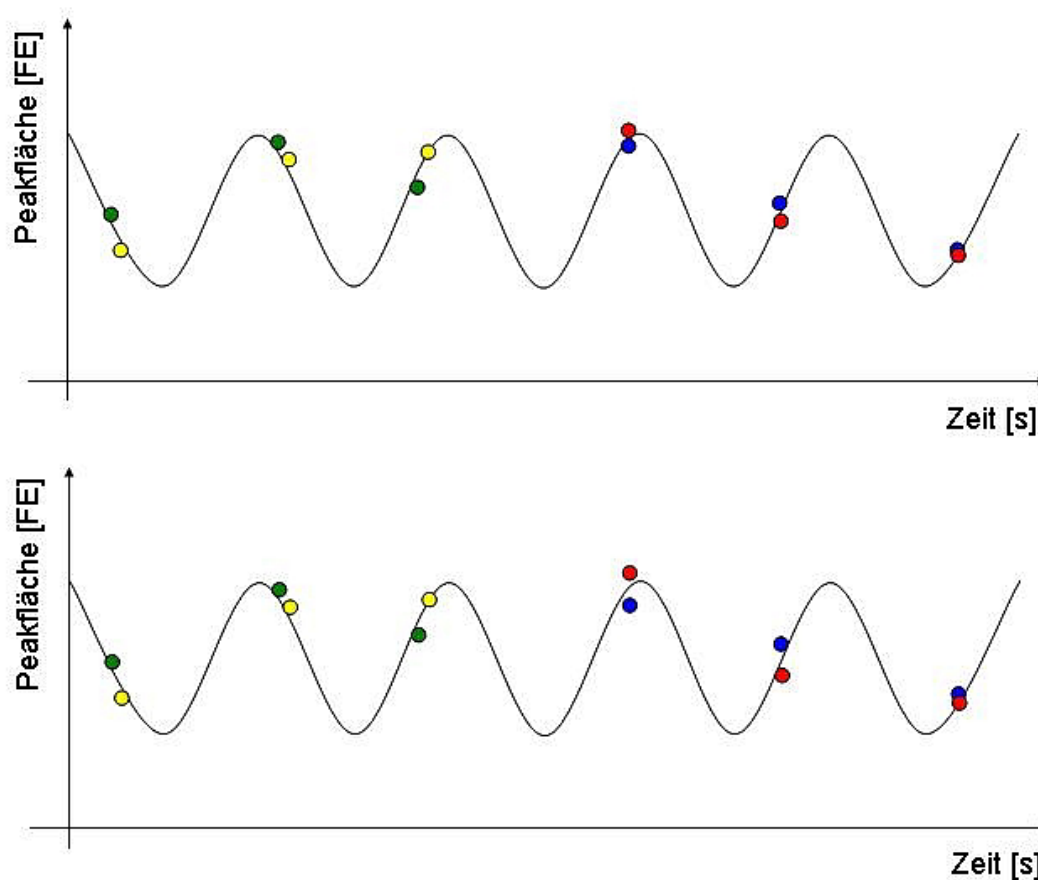


Abb. 7.4.5-1: Oben: Theoretische Verbesserung der Präzision durch geringeren zeitlichen Abstand von Analyt und IS. Unten: Tatsächlicher Zustand bei längeren Messserien (Erläuterungen im Text). Durchgezogene Linie: theoretische Peakflächen

aufgrund der zeitlichen Schwankungen der Ionisierungsbedingungen. Die regelmäßige Schwankung der Linie dient der modellhaften Darstellung, in der Praxis sind der Betrag der Amplituden und die Phasenlänge variabel; gelbe und grüne Punkte: Peakflächen von Probe III; rote und blaue Punkte: Peakflächen von Probe II.

Durch das engere Zusammenrücken von Analyt und IS im Vergleich zu Probe I (Abb. 7.3.5-3) wird die Differenz der Peakflächen von Analyt und IS reduziert. Der Schwankungsbereich der Einzelwerte um den Mittelwert dieser Differenz wird ebenfalls kleiner und damit auch die RSD%. Die Präzision mit isotonenmarkiertem IS (Abb. 7.4.5-1 rechts) sollte etwas höher sein, da die Schwankungen vom Typ K1 vollständig kompensiert werden. Die Präzision wird nur noch von Varianzkomponenten bestimmt, die nicht durch IS auszugleichen sind (NK1) (Abb. 7.4.5-1 oben). Mit strukturverwandtem IS (Δt_{mig} ca. 30 Sekunden) können die zeitlichen Schwankungen größtenteils kompensiert werden, wobei noch Varianzursachen durch die unterschiedliche Molekülstruktur (in der Abbildung nicht dargestellt) hinzukommen.

Die Betrachtung kürzerer Messreihen macht diese Überlegungen deutlich: Die RSD% der Peakflächenquotienten von isotonenmarkiertem IS ist niedriger als die vom strukturverwandten IS, welche wiederum niedriger als die von strukturfremden IS ist.

Bei Messungen über längere Zeiträume gleichen sich die Präzisionen von Probe II und III einander an. Diese Beobachtung lässt sich folgendermaßen erklären: Durch die Quotientenbildung wird der Anteil der Varianzursachen vom Typ K1 an der Gesamtvarianz reduziert. Mit isotonenmarkiertem IS wird K1 vollständig, mit strukturähnlichem IS größtenteils entfernt, so dass die Varianzkomponenten vom Typ NK1 (Kap. 7.3.5.2) den Hauptanteil an der Gesamtvarianz stellen. Diese Varianzursachen betreffen nicht nur die absoluten Peakflächen, sondern auch die Peakflächenquotienten. Das Ausmaß dieser Variationsursachen ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Treten sie verstärkt auf, wie bei den Messreihen mit isotonenmarkiertem IS, kommt es zu einer Angleichung der Präzisionen. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Vorgang steigt mit der Länge der Messserie.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Existenz einer weiteren Gruppe von Varianzursachen. Auf diese Gruppe wird indirekt in [26] hingewiesen, indem eine

gegenseitige Beeinflussung von Analyt und isotoopenmarkierten IS beschrieben wird. Denkbare Varianzkomponenten dieser Art wären beispielsweise der genaue Anteil der Isotopomere an der Tröpfchenoberfläche und deren Konkurrenz um den Ladungsüberschuss (Kap. 3.1.1). Beide Faktoren spielen bei zeitlich versetzt eluierenden Substanzen eine untergeordnete Rolle, da dort nur Moleküle einer Substanz um die Ladung konkurrieren.

Die zusätzliche Varianzkomponente trägt die Bezeichnung „NI1“ (nur isotoopenmarkiert), da sie nur bei isotoopenmarkiertem IS auftritt. Ihr Anteil an der Gesamtvarianz ist sehr gering, wie die mit isotoopenmarkiertem IS erreichbaren hohen Präzisionen zeigen (Kap. 7.3.3, Kap. 7.3.5).

Das Resultat beider Erklärungen ist in Abbildung 7.4.5-1 ablesbar: Die Punkte in der rechten Hälfte der Darstellung sind weiter von der theoretischen Linie entfernt. Das letzte Pärchen symbolisiert einen Zeitpunkt, bei dem entweder NK1 oder NI1 besonders klein sind, so dass die höchst mögliche Präzision resultiert, die mit den Ergebnissen aus CE-UV-Bestimmungen vergleichbar ist.

7.5 Versuche mit der mehrfachen Injektion desselben Analyten (Probe IV & V)

7.5.1 Entwicklung der Proben

Die Idee, den Analyten gleichzeitig als IS zu verwenden, basiert auf einer Veröffentlichung von GEISER et al. [88] und wurde in dieser Form bisher noch nicht publiziert. Die Autoren des ebengenannten Artikels untersuchten die Präzision bei Mehrfachinjektion derselben Probe vor der Quantifizierung zur Erhöhung des Probendurchsatzes.

Bei der Verwendung von strukturverwandtem IS können zeitliche Schwankungen bei der Ionisierung teilweise kompensiert werden (Δt_{mig} ca. 30 Sekunden). Varianzkomponenten, die auf der unterschiedlichen Ionisierbarkeit der Substanzen basieren, zählen zu den Varianzursachen vom Typ NK1 und sind mit dieser Probe allerdings nicht erfassbar. Bei der Mehrfachinjektion desselben Analyten werden die auf der Ionisierbarkeit basierenden Varianzkomponenten aufgrund der gleichen Molekülstrukturen entfernt und gleichzeitig der Migrationszeitabstand von Probe III beibehalten. Desweiteren kann durch die Verkürzung des Migrationsabstands auf 10 – 15 Sekunden der Einfluss von K1 besser beurteilt werden. Mit dem Vergleich der Proben III, IV und V kann dann einerseits der Anteil des Migrationszeitabstands an der Gesamtvarianz, andererseits die Auswirkungen der strukturellen Ähnlichkeit von Analyt und IS anhand der Präzisionsverbesserung abgeschätzt werden. Die Proben IV (Neostigmin) und V (Paracetamol, Nikotinsäure) unterscheiden sich nur in der Länge der BGE-Zwischeninjektionen (Tab. 11.6.2-1). Bei allen Versuchen wurde die Kapillare „A“ eingesetzt. Bei Probe I wurde bereits nachgewiesen, dass bei der Detektion mit MS der Injektionsfehler eine untergeordnete Rolle spielt und damit bei diesen Versuchen vernachlässigt werden kann.

7.5.2 Untersuchung der Präzision

Die Ergebnisse der Proben I – III hinsichtlich des BGE-Einflusses auf Migrationszeiten, Peakflächen und deren Reproduzierbarkeiten wurden bei den Versuchen mit den Proben IV und V bestätigt.

Die Migrationszeiten verhalten sich, wie bei Probe I ausführlich beschrieben: bei BGE mit pH 8.5 ist der EOF am höchsten und stabilsten. Mit der Zugabe von organischem Lösemittel oder bei niedrigerem pH-Wert sinken Migrationsgeschwindigkeit und Präzision. Mit der Absenkung des pH-Werts und Zugabe von Isopropanol zum BGE wächst die Peakfläche der Analyten (Ausnahme: Neostigmin bei pH 8.5; 10 % Isopropanol).

Die Herausforderung bei diesen Versuchen bestand darin, die Dauer der Zwischeninjektionen des BGE so zu wählen, dass die fünf Peaks der Analyten zwar basisliniengetreunt sind, andererseits aber möglichst dicht beieinander migrieren. Dieses Ziel wurde mit den verwendeten, „starren“ Methoden nicht erreicht, denn es stellte sich heraus, dass die Wahl des BGE bei diesen Untersuchungen einen erheblichen Einfluss auf die Trennleistung des Systems hat (Abb. 7.5.2-1, 7.5.2-2). Theoretisch sollte der Abstand zwischen den Peaks unabhängig vom BGE durch die Injektionsdauer des BGE zwischen den Injektionen der Probelösung definiert sein, so dass bei der Methodenentwicklung ein Wert, der einen ausreichenden Abstand bei einem BGE gewährleistete, für die BGE-Injektion gewählt und für die anderen drei BGE übernommen wurde. Aus den Versuchen mit den Proben I und III war das Tailing des Neostigminpeaks bekannt, so dass bei Neostigmin die Injektionszeit der BGE-Injektion erhöht wurde.

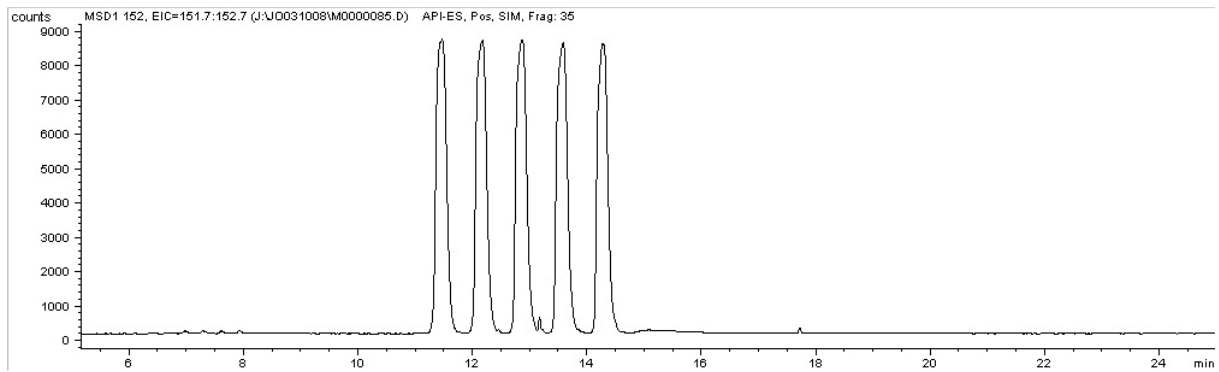


Abb. 7.5.2-1: Elektropherogramm der Mehrfachinjektion von Paracetamol (BGE: pH 4.0).

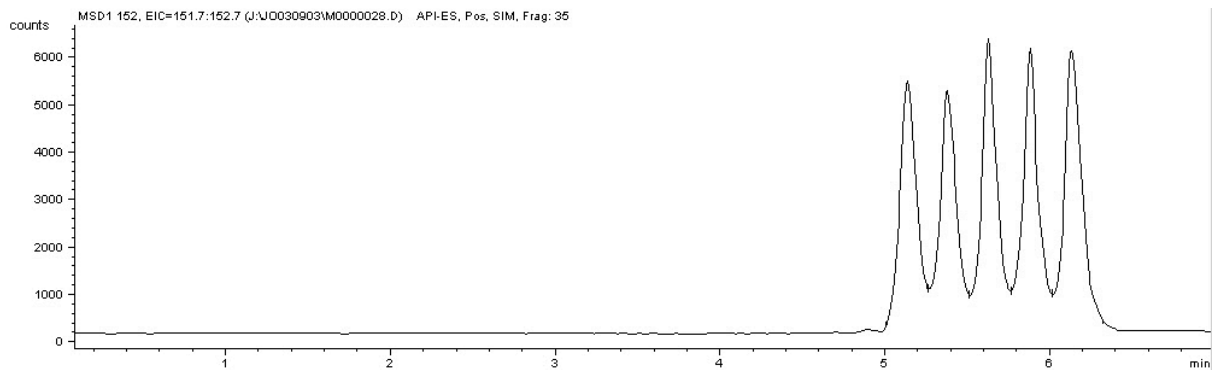


Abb. 7.5.2-2: Elektropherogramm der Mehrfachinjektion von Paracetamol (BGE: pH 8.5).

Die unterschiedlichen Trennleistungen der einzelnen BGE verkomplizierte die Auswahl von Integrationsparametern, welche die unterschiedlichen Peakformen gleichermaßen geeignet erfassen. Die durch die Integration hervorgerufenen Variationen erschwerten die Einordnung und den Vergleich der mit dieser Art IS erreichbaren Präzision, so dass in einigen Fällen nur Tendenzen und keine endgültigen Ergebnisse erhalten werden konnten.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	pH 4.0			pH 4.0; 10% Isopropanol		
Neostigmin	214000	5.64	45	234000	11.4	50
Paracetamol	108000	4.01	50	122000	19.7	45
Quotient Neostigm.	1.02	4.87	36	1.00	4.89	40
Quotient Paracet.	0.99	1.90	40	0.99	11.8	36
BGE	pH 8.5			pH 8.5; 10% Isopropanol		
Neostigmin	192000	4.55	50	175000	13.4	50
Paracetamol	51000	22.9	45	75200	3.18	50
Quotient Neostigm.	1.02	3.87	40	1.06	9.18	40
Quotient Paracet.	1.04	15.3	36	1.01	2.98	40

Tab. 7.5.2-1: Absolute Peakflächen mit RSD% aus je neun oder zehn Elektropherogrammen mit jeweils fünf Peaks, sowie die RSD%-Werte der Quotienten. Bei der Quotientenbildung wurde willkürlich der mittlere der fünf Peaks als IS bestimmt und die Peakflächen der übrigen vier Peaks durch die Peakfläche des IS geteilt. Aus den vier resultierenden Werten wurde der Mittelwert gebildet.

Die RSD% der absoluten Peakflächen variieren von 4.0% (n = 50) für Paracetamol bei pH 4.0 bis zu 22.9% (n = 45) für Paracetamol (BGE: pH 4.0; 10% Isopropanolanteil). Im Unterschied zu den Ergebnissen mit Probe I sind hier keine eindeutigen Ionisierungsvorteile von Neostigmin gegenüber Paracetamol erkennbar, denn die Höhe der Präzisionen der absoluten Peakflächen variiert in Abhängigkeit vom gewählten BGE (vgl. Tab. 7.5.2-1 BGE pH 8.5 mit und ohne Isopropanolzusatz). Die Erklärung liegt in der Integration der Peaks. So ist beispielsweise bei einem BGE mit pH 4.0 (Abb. 7.5.2-1) durch die Basislinientrennung eine Integration sehr leicht möglich (RSD% = 4% (Tab. 7.5.2-1)). Bei pH 8.5 (Abb. 7.5.2-2) ist eine Integration, bei der beispielsweise die Schultern am Anfang und Ende der fünf Peaks im Vergleich zu den mittleren Signalen korrekt bestimmt werden, nicht möglich. Die resultierende RSD% liegt daher bei 23% (Tab. 7.5.2-1). Ein weiterer Grund für die großen Unterschiede in den Beträgen der RSD% der absoluten Peakflächen einer Substanz könnte in einem unterschiedlich hohen Ausmaß der Variationsursachen K1 und NK1 liegen.

Wie sich auch schon bei den Untersuchungen mit Probe I abzeichnete, liegen die RSD%-Werte für Nikotinsäure mit über 50% weit über denen der beiden anderen Analyten. Die Ursache hierfür ist das niedrige S/N-Verhältnis in den

Elektropherogrammen der Nikotinsäureuntersuchungen. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse der Nikotinsäure nicht in die folgenden Vergleiche einbezogen.

	<i>RSD [%]</i>	<i>n</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>n</i>
BGE	<i>pH 4.0</i>		<i>pH 4.0; 10% Isopropanol</i>	
Quotient Neostigmin (4 Peaks)	4.87	36	4.89	40
Quotient Paracetamol (4 Peaks)	1.90	40	11.8	36
Quotient Neostigmin (2 Peaks)	3.02	20	3.95	24
Quotient Paracetamol (2 Peaks)	0.86	24	4.76	20
BGE	<i>pH 8.5</i>		<i>pH 8.5; 10% Isopropanol</i>	
Quotient Neostigmin (4 Peaks)	3.87	40	9.18	40
Quotient Paracetamol (4 Peaks)	15.3	36	2.98	40
Quotient Neostigmin (2 Peaks)	3.34	24	7.66	24
Quotient Paracetamol (2 Peaks)	10.3	20	2.42	24

Tab. 7.5.2-2: Vergleich der Präzision nach der Quotientenbildung aus allen Peaks eines Elektropherogramms (obere Zeilen, vgl. Tab. 7.5.2-1); darunter werden nur die direkt an den mittleren Peak (IS) angrenzenden Peaks einbezogen.

In den meisten Fällen wird die Präzision durch eine Datenreduktion erhöht. Dieser Effekt ist bei Paracetamol bei den BGE mit pH 4.0; 10% Isopropanol und pH 8.5 besonders ausgeprägt. Die Ursachen hierfür sind erstens die geringere Datenzahl selber, zweitens entfällt das Problem der Schulterintegration des ersten und des letzten Peaks. Drittens wird der Einfluss der zeitlichen Varianzkomponente reduziert, da die Peaks nur noch 10 – 15 Sekunden vom IS entfernt liegen und nicht mehr 10 – 40 Sekunden.

Liegen die Messungen zeitlich nicht nahe genug beieinander, ist diese Art des IS wirkungslos. Das beweist die exemplarische Untersuchung der Paracetamolpeakflächen der ersten Messserie aus Tabelle 7.2.1-1 (Probe I, 0.2 mM, pH 8.5). Aus dieser Serie wird eine beliebige Peakfläche als IS deklariert und der Quotient aus jeder einzelnen Peakfläche und dem IS gebildet. Der zeitliche Abstand zwischen der Untersuchung zweier Proben liegt damit im günstigsten Fall bei ca. 14 Minuten. Die anschließende RSD%-Bestimmung der Peakflächenquotienten ergibt 13.2% (n = 97), während die RSD% der absoluten Paracetamolpeakfläche 13.1% (n = 98) beträgt. Bei einem so großen Migrationszeitabstand von Analyt und IS kann K1 nicht mehr kompensiert werden, so dass in diesem Fall K1 und NK1 in die Gesamtvarianz nach der Quotientenbildung eingehen.

7.5.3 Vergleich mit den Ergebnissen der Proben I - III

Die mit Mehrfachinjektion und anschließender Quotientenbildung erreichbare Präzision liegt im Bereich der Präzision mit strukturverwandtem IS. In einigen Fällen ist die Präzision sogar mit der Präzision aus den Versuchen mit isotonenmarkiertem IS vergleichbar. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen untersuchten IS Typen zu gewährleisten, sollten beim Vergleich der Präzisionen Daten der Substanzen herangezogen werden, die in beiden Proben vorkommen (gleiche Struktur der Substanzen: Probe I mit Probe III und IV, Probe II mit V).

	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n	RSD [%]	n
Probe / BGE	pH 4.0		pH 4.0; 10% IPA		pH 8.5		pH 8.5; 10% IPA	
Peakflächenquotienten								
I) Paracet./Neostigm.	16.9	58			8.75	60		
II) PCM/d ₄ -PCM	10.6	18	15.0	16	3.15	25	6.25	19
II) PCM/d ₄ -PCM (Abschnitt)	1.60	9			0.97	14		
III) Atropin/Neostigmin	4.12	80	13.9	80	12.4	80	4.02	80
IV) Quotient Neostigmin	3.02	20	3.95	24	3.34	24	7.66	24
V) Quotient Paracetamol	0.86	24	4.76	20	10.3	20	2.42	24

Tab. 7.5.2-3: Vergleich der RSD% der Peakflächenquotienten aller fünf Proben. Bei den Proben IV und V wurden die RSD%-Werte der Quotienten der direkt benachbarten Peaks eingesetzt. Alle Proben wurden auf derselben Kapillare „A“ getrennt.

Der Vergleich der RSD%-Werte in Tabelle 7.5.2-3 ergibt folgendes Bild: In der Regel ist die Präzision von Probe V höher als die Präzision von Probe II. Der Unterschied in der Migrationszeit von Analyt und IS bei Probe V nimmt daher eine untergeordnete Rolle ein, so dass mit beiden Arten des IS die Varianzursachen vom Typ K1 durch die Quotientenbildung vollständig kompensiert werden. Eine leichte Absenkung der RSD% von Probe II durch die Varianzursachen vom Typ NI1 ist außerdem denkbar. Aus Tabelle 7.5.2-3 werden die Möglichkeiten mit isotonenmarkierten IS nicht ganz deutlich, da die hohen Präzisionen mit Probe II aus Tab. 7.3.5-2 nicht mit aufgeführt werden. Werden diese Werte beachtet, zeigt sich, dass die Präzisionen mit Probe II und V vergleichbar sind.

Außer bei BGE pH 8.5; 10% Isopropanol ist die Präzision mit Probe III niedriger als mit Probe IV. Da der Migrationszeitabstand bei beiden Proben ähnlich ist, wird der

hohe Einfluss der Strukturgleichheit von Analyt und IS auf die erreichbare Präzision deutlich.

7.5.3.1 Resümee aus dem Vergleich

Mit den Experimenten zur Mehrfachinjektion konnte gezeigt werden, dass mit einem solchen IS bei längeren Messserien eine dem isotoopenmarkierten IS vergleichbare Präzision erreichbar ist. Die Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist, dass die zeitabhängige Varianzkomponente (K_1) durch Substanzen, die nahe genug (< 30 Sekunden) beieinander migrieren, und die, aufgrund von Strukturgleichheit, gleich gut ionisierbar sind, vollständig kompensiert werden. Daher ist die Zweitinjektion des Analyten eine kostengünstige Alternative zu isotoopenmarkierten IS, wobei bei der Nachinjektion auf die zeitliche Nähe beider Peaks geachtet und eine Kontrolle der Matrix auf Komponenten gleicher Masse-Ladungs-Verhältnisse, deren Peaks sich eventuell mit dem IS Peak überlagern könnten, geachtet werden sollte. Wie bei isotoopenmarkiertem IS sollte zur Quantifizierung der IS eine bekannte Konzentration aufweisen.

8 Einordnung der experimentellen Ergebnisse in den Zusammenhang mit bereits veröffentlichten Daten

Eine Literaturrecherche zur quantitativen Analytik der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen ergibt sehr viele Trennverfahren mit UV-Detektion und LC- oder GC-MS-Methoden. In wenigen Veröffentlichungen werden Methoden beschrieben, bei denen die Trennung und Quantifizierung mit Hilfe von CE-MS erreicht wird.

Quartäre Ammoniumsalze wurden schon früh mit ESI-MS untersucht, da sie sehr leicht als Ion in die Gasphase überführbar sind. Der erste Bericht über eine validierte Methode zur Quantifizierung von Neostigminbromid findet sich in [105]. Auf eine Vortrennung mit CE wurde verzichtet und der Analyt direkt injiziert, so dass einige Ursachen für Variationen entfallen. Andererseits ist so die Präzision der Elektrosprayionisation ablesbar. Die RSD% bei $n = 5$ für den Peakflächenquotienten von Neostigmin und einem homologen IS beträgt 1.8% und bestätigt die Überlegungen bei der Probenzusammenstellung (Kap. 7.1.1) bezüglich der höheren Präzision von Neostigmin durch das Entfallen des Protonierungsschritts. Für Quantifizierungen mit Nanospray-ESI-MS und chipbasierter CE wird in [106] eine RSD% von 4.8 – 5.0% ohne Anwendung eines IS angegeben. Der Vergleich mit den Ergebnissen von den Proben I, III und IV macht die erhöhte Anzahl von Variationsursachen durch den sheath-flow deutlich. Die zweite Substanz mit einer quartären Ammoniumstruktur ist das Cetylpyridiniumkation. Die einzige Methode zur Quantifizierung, die eine CE-Trennung beinhaltet, detektiert den Analyten mit einem UV-Detektor [102]. Die Autoren weisen auf die extrem langen Peaktailings bei der Verwendung rein wässriger BGE hin und geben an, einen 50% Acetonitril enthaltenden BGE zu verwenden, der die Wandinteraktionen effektiv reduziert.

Paracetamol und seine Metabolite werden in [101] mit Hilfe von UV-Detektion quantifiziert und durch MS-Detektion identifiziert. Die Angaben zur Präzision der Quantifizierung beziehen sich auf Ergebnisse aus Plasma und Urin, so dass ein Vergleich mit den UV-Messungen in dieser Arbeit aufgrund von Matrix- und Probenaufbereitungseffekten wenig sinnvoll erscheint.

Es existieren drei Arbeiten, die Atropin einsetzen: Die Autoren von [81] setzen Atropin als IS zur Quantifizierung von Strychnin (RSD% = 5.5%) und Brucin (RSD%

= 2.9%) mit $n = 5$ ein (Tab. 8-2). Die RSD% der absoluten Peakfläche von Atropin wird nicht angegeben. Bei der chiralen Trennung der beiden optischen Isomere des Atropins ((\pm)-Hyoscyamin) wird für (+)-Hyoscyamin eine RSD% von 4.5%, für (-)-Hyoscyamin 5.5% bei Verwendung eines BGE aus Ammoniumacetat (pH 7) angegeben [107]. Als IS wurde Homatropin eingesetzt. Diese Werte sind mit den Ergebnissen aus Tabelle 7.4.3-1 vergleichbar, bei denen mit Neostigmin als IS eine RSD% von 4% für das Enantiomergemisch erreicht wurde. Atropin und Scopolamin wurden in [104] basisliniengetrennt und anschließend mit einem Massenspektrometer detektiert, allerdings wurden keine Angaben zur Präzision gemacht.

Zur Quantifizierung von Nikotinsäure mit CE-MS wurden keine Literaturstellen gefunden.

Bei einer weiter gefassten Betrachtung des derzeitigen Literaturstandes zur Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie wird schnell deutlich, dass dieses Verfahren in den meisten Veröffentlichungen zur Identifikation der Analyten und nicht zur Quantifizierung eingesetzt wird. Werden in Artikeln Daten zur Quantifizierung angegeben, fehlen oft Angaben zur Präzision oder es werden Datenzahlen verwendet, welche die Aussagekraft der angegebenen RSD% erheblich abschwächen (z.B. $n = 3$).

In den Tabellen 8-1 – 8-3 werden die Präzision und die wichtigsten analytischen Parameter von publizierten CE-MS-Methoden angegeben. Die Tabellen sind nach der verwendeten Datenzahl (n) als „Qualitätsparameter“ für die gemessene Präzision sortiert. Fehlt die Angabe des Interface, wurde ein sheath-flow Interface verwendet. Ist bei der BGE- oder sheath-flow-Zusammensetzung kein Lösemittel angegeben, handelt es sich um rein wässrige Lösungen. Gibt eine Quelle mehrere RSD%-Werte für dieselbe Methode an, z.B. Wiederhol- und Mehrtages-Standardabweichung, wurden die niedrigeren RSD%-Werte übernommen. Wie bereits erwähnt, sollte auch die Konzentration des Analyten und damit das Signal-Rausch-Verhältnis beim Vergleich der Präzision verschiedener Methoden beachtet werden. Je näher die Konzentration an der Bestimmungsgrenze liegt, desto niedriger ist die resultierende Präzision, da Schwankungen des Integrationsfehlers einen immer größeren Einfluss bekommen [91]. Das bedeutet, dass bei einer Substanz mit niedriger

Ionisierungsausbeute im Vergleich zu einer leicht ionisierbaren Substanz gleicher Konzentration die Präzision aufgrund des niedrigeren S/N geringer ausfällt [46, 108].

Ein allgemeiner Vergleich der Daten ist wegen der unterschiedlichen Ionisierbarkeiten und Konzentrationen der Analyten und verschiedener Matrices und Probenaufbereitungen schwierig. Dennoch stimmen die Tendenzen in den Tabellen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. So sind die RSD% ohne IS in der Regel etwas höher als mit IS. Ein klarer Vorteil des isotopenmarkierten IS gegenüber strukturverwandtem ist nicht deutlich erkennbar. Die Verwendung von Mehrfachinjektion als Möglichkeit für die Bildung eines IS wurde bei CE-MS in keiner Quelle erwähnt.

In Tabelle 8-1 sind die Ergebnisse quantitativer Untersuchungen eingeflossen, bei denen auf den Einsatz eines IS verzichtet wurde. Es ist erkennbar, dass der Typ des Analysators am Massenspektrometer keinen Einfluss auf die erreichbare Präzision hat.

In Tabelle 8-3 werden Methoden zur Quantifizierung von Biomolekülen aufgeführt. Die RSD%-Werte sind mit denen kleinerer Moleküle vergleichbar. Bisher gibt es noch keine Veröffentlichungen, bei denen markerbasierte Methoden zur Quantifizierung von Proteinen, wie ICAT [109], in Kombination mit CE-MS eingesetzt werden.

Die RSD%-Werte sind von der Verwendung von Acetat oder Formiat im BGE oder sheath-flow unabhängig. Für die Methodenentwicklung bedeutet das, dass die Wahl des BGE auf der höchsten Trennleistung und der bestmöglichen Ionisierungsausbeute basieren sollte und primär nicht auf eine möglichst hohe Präzision der Peakflächen optimiert werden muss.

Ein Blick in die Tabellen 8-1 – 8-3 zeigt, dass sich trotz der bereits erwähnten Tendenz von Acetat zur Ionenpaarbildung (Kap. 6.2.2; [59]), bei der Verwendung von Acetat im BGE oder sheath-flow keine negativen Auswirkungen auf die Präzision ergeben. Offenbar ist nur die Intensität der Peakflächen von diesem Phänomen betroffen. Solange die Konzentration der Analyten nicht in der Nähe des LOD liegt, wird die Präzision der Messung also nicht beeinflusst.

In sehr wenigen Artikeln wurden die Auswirkungen der Variation des BGE auf die Peakflächen oder deren Präzision ausführlich untersucht. Die unterschiedlichen Signalintensitäten bei den in dieser Arbeit untersuchten pH-Werten ergeben vergleichbare Präzisionen. Die Autoren von [12] beschreiben sehr ausführlich die Entwicklung einer Methode mit einem sheath-flow Interface zur Bestimmung von Lamotrigin in menschlichem Plasma. Im Zuge der Methodenentwicklung wird der Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke des BGE auf das S/N im Elektropherogramm untersucht. Bei den Experimenten wurde immer Ammoniumacetat als Elektrolyt eingesetzt. Mit steigendem pH-Wert (Bereich 4.0 – 6.8) sinkt das S/N, das bedeutet, die Peaks werden im Vergleich zum Rauschen kleiner. Die Ursache könnte neben der vermehrten Ionenpaarbildung durch die erhöhte Acetatkonzentration das Sinken der Hydroniumkonzentration sein. Die Ergebnisse der Experimente zur Ionenstärke des BGE weisen auf die Konzentration der Hydroniumionen, denn bei einer steigenden Elektrolytkonzentration von 5 mM auf 20 mM steigt das S/N ebenfalls. Interessanterweise sinkt das S/N bei der Erhöhung der Konzentration von Acetat im sheath liquid von 5 mM auf 50 mM ganz erheblich, so dass hier von einer Beeinflussung durch Ionenpaarbildung ausgegangen werden kann.

Bei der Verwendung organischer Lösemittel im BGE oder NACE weisen die angegebenen Präzisionen keine großen Unterschiede zu auf rein wässrigem BGE basierenden Methoden auf. Dieses Resultat ist mit denen in Tabelle 12.2-4 summierten Ergebnissen vergleichbar. Die Ursache hierfür liegt im dominierenden Einfluss des sheath liquid auf die Ionisierungseffizienz. Bei der Verwendung eines sheathless Interface könnte eine erhöhte Flüchtigkeit des BGE die Präzision erhöhen. Bisher existieren aber noch keine Publikationen, in denen mit einem solchen Interface und NACE quantitative Daten erarbeitet wurden. Einen Ausblick auf die Möglichkeiten mit einem sheathless Interface gibt [37]. Dort wird bei der Zugabe von 20% Methanol zu formiatbasiertem BGE ein Zuwachs der Peakfläche von Substanz P um das 2.3fache und beim S/N um das 3fache festgestellt. In [70] wurden bei der Bestimmung von Carnitinen und Acylcarnitinen mit einem sheath-flow Interface rein wässrige, aus Wasser und Acetonitril oder Methanol bestehende oder Acetonitril/Methanol Mischungen als BGE verwendet. Sowohl Acetat als auch Formiat wurden getestet, wobei das Hauptaugenmerk der Autoren auf der Verbesserung der Trennleistung lag. Die Peakflächen waren bei nicht-wässrigem

BGE am höchsten, ein rein wässriger BGE mit Formiat ermöglichte höhere Peakflächen als Mischungen aus Wasser und einem organischen Lösemittel, wobei hier Acetat als Elektrolyt verwendet wurde. Es zeigt sich also, dass die Signalintensität mit dem Zusatz von organischen Lösemitteln zum BGE nicht unbedingt ansteigen muss (Tab. 12.2-4).

Die Präzision einer CE-MS-Methode ist ebenfalls von der Polarität der detektierten Ionen unabhängig. Auch beim Einsatz der „wrong-way-around“ Ionisierung [28, 110], also der Bildung von Kationen aus stark alkalischer Lösung oder umgekehrt, wurden keine erhöhten RSD%-Werte im Vergleich zu konventioneller Ionisierung entdeckt [60, 71, 86, 111].

In der bereits erwähnten Arbeit von HAU et al. [78], in welcher der Einfluss von Druck auf die Präzision einer Peptidtrennung untersucht wurde, wird eine Senkung der RSD% des Medians der Peakflächen auf 1.7 – 5.1% ($n = 10$) durch das Anlegen von Druck angegeben. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit keine signifikante Erhöhung der Präzision durch das Anlegen von Druck beobachtet werden. Da weitere Veröffentlichungen über die Anwendung von Druck in der CE-MS [7, 59, 112-114] keine Aussage zum Einfluss auf die Präzision machen, bleibt ein endgültiges Urteil bei dieser Fragestellung abzuwarten.

Bei der Betrachtung der Präzisionen in Tabelle 8-1 und 8-2 wird der Vorteil der Verwendung von IS deutlich.

Durch die Verwendung eines IS mit ähnlicher Struktur zu den Analyten konnte die Präzision einer CE-MS-Methode zur Quantifizierung von Benzodiazepinen im Vergleich zu derjenigen der absoluten Peakflächen um den Faktor 2 – 3 erhöht werden [59]. Bei der quantitativen Bestimmung von Amphetaminderivaten stieg die Präzision durch den Einsatz eines strukturverwandten IS um das Vierfache [9]. In Tabelle 7.4.3-1 werden die RSD% der absoluten Peakflächen und der Peakflächenquotienten von Probe III angegeben. Bei den BGE mit pH 4.0 und 8.5 ist eine Halbierung bzw. Viertelung der RSD% durch die Quotientenbildung mit der Peakfläche des IS erreicht worden.

Die von GEISER et al. in [88] vorgestellte Möglichkeit der Mehrfachinjektion der Probe mit dem Ziel der Analysenzeitsenkung ergab eine Mehrtages-Standardabweichung der absoluten Peakflächen von 5% ($n = 21$). Dieser Wert lag in demselben Bereich wie die RSD% einer einfachen Injektion von Probe und

strukturverwandtem IS und zeigt, dass die Mehrfachinjektion nicht zu einer Senkung der Präzision führt. Die Ergebnisse der Proben IV und V liefern aufgrund der in Kapitel 7.5.2 beschriebenen Injektionsproblematik ein heterogenes Bild. Die Tabelle 7.5.2-1 enthält sowohl RSD%-Werte (BGE: pH 4.0), die dem Wert aus [88] entsprechen, als auch solche, die oberhalb des Literaturwertes liegen. Der Einsatz dieses Verfahrens als IS wurde sonst nicht weiter beschrieben, so dass auch keine Vergleichswerte für die Präzision der Peakflächenquotienten zur Verfügung stehen.

Wie bereits erläutert, entfallen bei der Nutzung von isotopenmarkierten IS die Varianzursachen K1. Außerdem werden durch die identische Molekülstruktur Matrixeffekte am effektivsten kompensiert [66]. Die Überlegenheit eines isotopenmarkierten IS wurde von MORRISSON et al. bei der Bestimmung von Diazepam demonstriert [115]. Durch den Wechsel von Nitrazepam auf D₅-Diazepam verbesserte sich die RSD% um 6.5 Prozentpunkte. Bei diesen Versuchen fand allerdings vor der massenspektrometrischen Detektion keine elektrophoretische Trennung statt, sondern die Analyten wurden direkt in die Ionenquelle injiziert. Das reduziert die Anzahl der Ursachen für Variationen, so entfallen z.B. die Kopplung zweier Stromkreise oder Schwankungen des EOF. Dennoch sind die Resultate dieser Untersuchung äußerst interessant, denn durch die Direktinjektion entfällt K1, da Analyt und IS in beiden Fällen gleichzeitig ionisiert werden. Das erhöht den Einfluss von NI1, der bei CE-MS Kopplung sonst nur bei isotopenmarkierten IS eine Rolle spielt. Hier konkurrieren also auch die strukturähnlichen IS direkt auf der Tropfenoberfläche, so dass anhand des Unterschieds der RSD%-Werte der hohe Einfluss der gleichen Struktur von Analyt und IS erkennbar wird. Dennoch sollte nicht vergessen werden, dass die Ionisierbarkeit einzelner Spezies höchst unterschiedlich ist und die prozentuale Verbesserung aus diesem Versuch nicht auf andere Kombinationen von Analyt und IS übertragbar ist.

Die höhere Präzision von Methoden mit isotopenmarkiertem IS im Vergleich zu strukturell ähnlichem IS deutet sich bereits in Tabelle 8-2 an. Noch deutlicher wird der Präzisionszuwachs beim direkten Vergleich der verschiedenen IS bei einer Methode. NÚÑEZ et al. haben bei der Quantifizierung von Herbiziden, die ein quartäres Stickstoffatom enthalten, durch den Einsatz von isotopenmarkiertem IS die RSD% um 3 – 10 Prozentpunkte gesenkt (n = 6) [26]. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde im Durchschnitt eine RSD% für Paracetamol von ca. 14% (n = 99) (Tab. 7.2.5-1) mit Neostigmin als IS erreicht. Mit deuteriertem

Paracetamol als IS lag die RSD% bei 3.4% ($n = 25$). Die einzige publizierte Arbeit, die signifikante Daten zur erreichbaren Präzision mit strukturanalogenem und isotoopenmarkiertem IS enthält, stammt von STOCKVIS et al. [68]. Bei der Quantifizierung von Kahalalide F mittels LC-MS-MS wurde mit strukturverwandtem IS eine RSD% von 8.6% ($n = 284$) und mit isotoopenmarkiertem IS eine RSD% von 7.6% ($n = 340$) erreicht. Dabei wurde der signifikante Unterschied beider RSD%-Werte statistisch nachgewiesen.

Obwohl bei MS-Detektion ein IS zur Identifikation der Analyten über die Migrationszeit nicht notwendig ist, wurde in einigen Arbeiten ein IS zum Ausgleich von Schwankungen der Mobilitäten eingesetzt. Für die relative Migrationszeit von Ipratropiumbromid wird in [51] eine RSD% von 0.14% ($n = 28$) mit Benzyldimethylphenylammoniumchlorid als IS angegeben. Bei der Verwendung von Neostigmin als IS für Paracetamol wurde bei den Versuchen mit Probe I eine etwas höhere RSD% von 0.64% (Tab. 7.2.7-2) erreicht. Bei den Untersuchungen von Benzodiazepinen in [59] wurde bei Trennungen mit appliziertem Druck eine RSD% der Migrationszeiten von 0.7 – 1.0% erreicht. Nach der Korrektur durch einen IS sinkt die RSD% 0.4 - 0.5% ($n = 7$). Bei den Versuchen mit Probe II bei angelegtem Druck während der Trennungen lag die RSD% mehrfach bei 0.4% ohne Korrektur durch einen IS (Tab. 7.3.6-1).

In der eben bereits erwähnten Abhandlung von McCLEAN et al. [59] ist der Einfluss der mit den Experimenten dieser Arbeit bestimmten Parameter „Strukturähnlichkeit“ und „zeitliche Nähe“ zu erkennen. In der Veröffentlichung werden die Benzodiazepine N'-Desmethyl-diazepam (IS), Diazepam, Oxazepam und Temazepam aufgetrennt (die Migrationsreihenfolge entspricht der Reihung der Aufzählung).

Die Struktur der Analyten und des IS sind sehr ähnlich, so dass die Differenz der Migrationszeiten von Diazepam und dem IS etwa 30 Sekunden beträgt. Oxazepam und Temazepam eluieren ebenfalls fast gleichzeitig, aber ungefähr 2 Minuten später. Die Schwankungen der Gruppe K1 werden bei der Korrektur der Peakflächen mit dem IS in unterschiedlichem Ausmaß entfernt. Die höchste Präzision wird erreicht, wenn IS und Analyt möglichst dicht beieinander migrieren: N'-Desmethyl-diazepam (IS) und Diazepam RSD% von 5.7% ($n = 5$). Liegen die Peakflächen von Analyt und

IS weiter auseinander, resultieren nach der IS-Berechnung RSD%-Werte bei 11.7% (Oxazepam) und 9.7% (Temazepam). Diese Werte sind mindestens vier Prozentpunkte höher als bei dem zeitlich nahe eluierenden IS-Analytpärchen. Der Einfluss der strukturbedingten unterschiedlichen Ionisierbarkeiten trägt ebenfalls zu den unterschiedlichen Präzisionen bei. Diese Tendenzen wurden mit den Untersuchungen der Proben I – III bestätigt. Zu denen in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen passen ebenfalls die Resultate aus [9]. Bei den Experimenten zur Bestimmung verschiedener Amphetaminderivate eluieren alle fünf Analyten und der IS innerhalb von 30 Sekunden. Die Beträge der RSD% Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Proben III – V. Die geringfügig unterschiedlichen RSD%-Werte aus [9] können aufgrund des geringen zeitlichen Abstands von Analyt und IS unter anderem auf die individuellen Ionisierbarkeit der Substanzen zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass für eine hohe Präzision die strukturelle Ähnlichkeit wichtiger als die extreme Nähe von Analyt und IS ist.

Abschließend sollen noch die verschiedenen Präzisionen von Quantifizierungen mit UV- und MS-Detektion beurteilt werden. Dieser Vergleich ist nur sinnvoll, wenn der verwendete BGE bei beiden Detektionsmethoden identisch ist. Hier liegen ebenfalls nur sehr wenige Veröffentlichungen vor, die eine Einordnung der Ergebnisse von Probe I zulassen. In Tabelle 7.2.2-1 ist erkennbar, dass die RSD% der Peakflächenquotienten mit UV-Detektion ca. 3 - 4 Prozentpunkte niedriger ist als bei MS-Detektion. Dieser Bereich entspricht den Ergebnissen aus [88], wobei in dieser Veröffentlichung die Analyten unterschiedlich konzentriert sind. Da aber nicht in der Nähe des LOD gearbeitet wurde, ist ein Einfluss auf die Präzision eher unwahrscheinlich. Auf Artikel, in denen die Präzision der Untersuchung der gleichen Proben mit UV- und MS-Detektion mit unterschiedlichen BGE verglichen wird, soll hier nur hingewiesen [71, 116, 117] werden.

8 Einordnung der experimentellen Ergebnisse

Analyt(-en)	Probenkonz.	Pol.	Analys.	Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten
Carrageenane	0.03 mg/mL	+	TQ / TOF	25mM NH ₄ Ac; pH 6.9
Pestizide	1 mg/L	+	IT	50mM NH ₄ Fo; pH 4.0
Herbizide	1 mg/L	+	IT	16mM (NH ₄) ₂ CO ₃ , 24mM HFo; pH 6.4
Melaminharze	0.1 ppm	+	TOF	300mM HFo in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)
Phenole	40 ppm	+	IT ⁴⁾	20mM CHES; pH 10.0
Melaminharze	0.05 ppm	+	TOF	300mM HFo in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)
Tamoxifen & Metabolite	2 - 300 ng/mL	+	SQ	20mM NH ₄ Ac in MeOH/ACN (70:30 v/v)
Flavonoide	5 mg/mL	-	SQ	40mM NH ₄ Ac in ACN/H ₂ O (15:85 v/v); pH 9.5
Clofibrinsäure	500 mg/L	-	SQ	20mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (60:40 v/v)
Naproxen	500 mg/L	-	SQ	20mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (60:40 v/v)
Bezafibrat	500 mg/L	-	SQ	20mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (60:40 v/v)
Designerdrogen	500 ng/mL	+	SQ	50mM NH ₄ Ac; pH 4.5
kurze Carbonsäuren	10 mg/L	-	IT	20mM NH ₄ Fo; pH 10.0
Glycoalkaloide aus Solanaceen	0.01 - 0.5 mg/L	+	IT	50mM NH ₄ Ac und 1.2M HAc in ACN/MeOH (90:10 v/v)
Pestizide	0.5 - 10 µg/mL	-	SQ	32mM NH ₄ Fo; pH 3.1
Thiabendazol / Procymidon	4 mM	+	SQ	12mM NH ₄ Fo / 20mM HFo in MeOH/H ₂ O (2:98 v/v); pH 3.5
Sildenafil & ein Metabolit	100 ng/mL	+	IT	10mM NH ₄ Ac; pH 4.5
Aminosäuren in Nahrungsmitteln	5 mg/L	+	SQ	300mM HFo
Serotonin	1 µM	+	TOF ⁶⁾	0.5mM CuCl ₂
Neostigmin, Fenoterol, Salbutamol	10 µg/mL	+	SQ ⁵⁾	1.25mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v); pH 5.0
Benzodiazepine	5 ppm	+	IT	100mM HFo + 1mM TFA + CEofix® accelerator
basische Arzneistoffe	2 ppm	+	IT	100mM HFo + 1mM TFA + CEofix® accelerator
Aminosäuren	2.5 mM	+	SQ	1M HFo
Organische Säuren	30 mg/L	-	SQ	2mM TMA + 5mM TRIS; pH 8.5
Pestizide	5 - 7.5 ng/mL	+	QIT	300mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (10:90 v/v); pH 4.0
Pestizide	0.25 - 2.5 µg/mL	+	SQ	300mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (10:90 v/v); pH 4.0
Glyphosat / Glyphosinat -Metabolite	25 µM	-	IT ¹⁾	1mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v); pH 6.3
Pestizide	25 µg/mL	+	IT	300mM HAc; pH 4.0
Imazamox	200 ng/mL	+	SQ	10mM NH ₄ Fo; pH 6.7 – 7.0
Neostigmin, PCM, Nikotinsäure	0.02 - 2 mmol/L	+	SQ	10mM NH ₄ Ac; pH 4.0 oder 8.5

Tab. 8-1: Methoden zur Quantifizierung von Molekülen mit einer Masse < 1000 Da, nach steigender Datenzahl und RSD%-Wert sortiert. Proteine und Peptide werden gesondert in Tabelle 8-3 aufgeführt. Alle Methoden verzichten auf eine Korrektur der Peakflächen durch einen IS. ¹⁾ sheathless Interface; ²⁾ liquid-junction Interface ³⁾ RSD% der Peakhöhe; ⁴⁾ nano-flow sheath liquid Interface; ⁵⁾ Nanospray Interface; ⁶⁾ LVI (Laser Vaporization/Ionization); Analys.: Analysatortyp des Massenspektrometers; Pol.: Polarität der detektierten Ionen; Ac: Acetat; HAc: Essigsäure; Fo: Formiat; HFo: Ameisensäure; CHES: 2-[N-cyclohexylamino]ethansulfonsäure; CEofix®: Reagenz zur Beschichtung von Kapillaren; PIPES: Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure); TMA: Trimellitsäure (1, 2, 4-Benzentricarbonsäure); TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Fortsetzung auf der gegenüberliegenden Seite.

<i>Zusammensetzung des sheath liquid</i>	<i>Peakflächen RSD [%]</i>	<i>n</i>	<i>Quelle</i>
IPA/BGE (80:20 v/v)	0.5 - 6.0	3	[78]
MeOH/50mM HFO (50:50 v/v)	2.9 - 4.9	3	[118]
2% TEA in MeOH/H ₂ O (82.5:17.5 v/v)	3.8 - 6.4	3	[119]
0.1% HFO in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	6.3	3	[120]
IPA/H ₂ O/NH ₄ OH (80:20:0.5 v/v)	9.1 ³⁾	3	[58]
0.1% HFO in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	30.0	3	[120]
MeOH	1.0 - 44.0 ³⁾	3	[121]
0.1% Triethylamin in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	2.8	4	[117]
0.1% NH ₄ OH in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v)	6	4	[111]
0.1% NH ₄ OH in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v)	8	4	[111]
0.1% NH ₄ OH in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v)	10	4	[111]
ACN/H ₂ O/HAc (50:49.5:0.5 v/v)	0.2 - 1.3	5	[122]
5mM NH ₄ OH in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	1.4 - 4.2	5	[123]
1% HAc in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	<1.6%	5	[124]
MeOH/BGE (20:80 v/v)	1.9 - 7.0	5	[89]
12mM NH ₄ FO / 20mM HFO in MeOH/H ₂ O (2:98 v/v); pH 3.5	2.3 - 3.2	5	[125]
MeOH/H ₂ O (70:30 v/v) + 0.5% HAc	2.5 - 3.4	5	[126]
0.6% HFO in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	3.6 - 12.6	5	[75]
entfällt	20.4 - 22.1	5	[127]
entfällt	4.8 - 5.0	6	[106]
0.5% HFO in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v)	4.8 - 11.8	7	[128]
0.5% HFO in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v)	5.6 - 14.3	7	[129]
5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	2.0 - 4.7	8	[130]
0.25% HFO in IPA/H ₂ O (50:50 v/v)	2.1 - 5.3	9	[60]
300mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (10:90 v/v); pH 4.0	4.3 - 6.7	10	[131]
300mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (10:90 v/v); pH 4.0	5.0 - 8.9	10	[131]
entfällt	7.0 - 12.0	10	[132]
IPA/H ₂ O (65:35 v/v)	9.7 - 11.0	15	[82]
5mM NH ₄ FO in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v), pH 3.7	3.6	21	[133]
1% HAc in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	7.0 - 25.0	>58	[46]

8 Einordnung der experimentellen Ergebnisse

	Analyt(-en)	Probenkonzentration	IS (Konzentration)	Pol.	An.
A	Phenole	30 ppm	p-Chlorophenol (3 ng)	-	SQ
	Clenbuterol	50-500 µg/mL	Salbutamol (100 µg/mL)	+	TQ
	Tetramin	65 - 1280 µg/g	Tetraethylammonium	+	TQ
	Amphetamine	0.5 µg/mL	1-Amino-4-phenylbutan (0.5 µg/mL)	+	SQ
	Nucleotide & Coenzyme	2.1 - 8.9x10 ⁴ nmol/g	PIPES (400 µM)	-	SQ
	Aminosäuren & Amine	9.4 - 8.5x10 ³ nmol/g	Methioninsulfonat (400 µM)	+	SQ
	Organische Säuren & Zuckerphosphate	6.6 - 3.4x10 ³ nmol/g	PIPES (400 µM)	-	SQ
	γ-Hydroxybuttersäure	40 - 160 µg/mL	Maleinsäure (100 mg/mL)	-	IT
	Alkaloide	40 mg/L	Atropin (40 mg/L)	+	IT
	Atropin	1 mg/mL	Homatropin (1mg/mL)	+	SQ
	Benzodiazepine	10 ⁻⁴ mol/L	n-Methyldiazepam (10 ⁻⁴ mol/L)	+	IT
	Alkylbenzensulfonate	2 mg/L	1-Naphtalensulfonat (0.5 mg/L)	-	SQ
	Multivalente Anionen	10 - 500 µmol/L	PIPES (0.0056 µmol)	-	SQ
	Amphetamine	1 µg/mL	MDPA (1µg/mL)	+	SQ
	Aminosäuren	100 mmol/L	Methioninsulfonat (200 mmol/L)	+	TQ
	Glucuronide vom Nitrocatechol-Typ	25 µg/mL	Nitecapon 3-o-Glucuronid (30µg/mL)	-	TQ
	Lidocain	5 mg/L	Procain (5 mg/L)	+	SQ
	Atropin	0.1 mmol/L	Neostigmin (0.1 mmol/L)	+	SQ
B	Carnitin / Acylcarnitin	500 µg/mL	d ₃ -Carnitin / d ₃ -Acylcarnitin (5 µg/mL)	+	TQ ¹⁾
	heterocyclische aromatische Amine	0.5 oder 1.2 µg/g	deuterierte Amine (0.5 oder 1.2 µg/g)	+	IT
	Oxycodon & Metabolite	1 µg/mL	deuterierter Analyt (1µg/mL)	+	IT
	EDTA in Plasma / Urin	197 mg/mL	¹³ C-EDTA (50 ng)	-	TQ ²⁾
	Herbizide	15 mg/L	deuterierter Analyt (1 mg/mL)	+	IT
	Methylphenidat	5 - 600 ng/mL	d ₃ -Methylphenidat (100 ng/mL)	+	IT
	(Des-)imipramin in Plasma	15 - 400 µg/mL	d ₃ -(Des-)imipramin (40 µg/mL)	+	TQ ¹⁾
	Carnitin / Acylcarnitin in Plasma	0.02 - 19 µg/mL	d ₃ -Carnitin (4 µg/mL) / d ₃ -Acylcarnitin (1.4 µg/mL)	+	TQ
	Carnitin / Acylcarnitin in Urin	0.04 -20 µg/mL	d ₃ -Acylcarnitin (1 µg/mL)	+	TQ
	Bisphosphonate	0.5 - 0.6 mg/mL	Phenylphosphorsäure (0.4 mg/mL)	-	TQ
	Paracetamol	0.13 mmol/mL	d ₄ -Paracetamol (0.13 mmol/mL)	+	SQ

Tab. 8-2: Methoden, die entweder einen strukturverwandten (Abschnitt „A“) oder isotopenmarkierten (Abschnitt „B“) IS verwenden. Sortierung und Fußnoten entsprechen denen von Tabelle 8-1. Die RSD%-Werte basieren auf den Peakflächenquotienten. CD: Cyclodextrin; DMCD: Dimethyl-β-cyclodextrin

Fortsetzung auf der gegenüberliegenden Seite.

8 Einordnung der experimentellen Ergebnisse

<i>Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten</i>	<i>Zusammensetzung des sheath liquid</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>n</i>	<i>Quelle</i>
30mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (10:90 v/v); pH 10.0	IPA/H ₂ O (25:75 v/v)	<10	2	[100]
10mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (20:80 v/v); pH 2.5; DMCD (40mM)	10mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (20:80 v/v); pH 2.5	5.7 - 12.1	3	[134]
100mM HFO	0.2% HFO in MeOH/H ₂ O (25:75 v/v)	2.3 - 29.4	3	[135]
1M HFO; pH 2.2; 3mM β-CD + 10mM DM-β-CD	MeOH/H ₂ O (50:50 v/v) mit 10mM NH ₄ Ac	2.4 - 7.2	3	[136]
50mM NH ₄ Ac; pH 7.5	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	5.1 - 49.6	4	[137]
1M HFO; pH 1.8	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	5.1 - 63.0	4	[137]
50mM NH ₄ Ac; pH 8.5	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	5.6 - 75.1	4	[137]
12.5mM NH ₄ FO; pH 8.35 mit Diethylamin	0.1% NH ₄ OH in MeOH/H ₂ O (90:10 v/v)	4.2 - 4.4	5	[114]
80mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (60:40 v/v) + 0,1% HAc	0.5% HAc in MeOH/H ₂ O (90:10 v/v)	2.9 - 5.5	5	[81]
30mM NH ₄ Ac; pH 7; sulfatiertem β-CD (2 mg/ml)	0.5% HFO in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	4.5 - 5.5	5	[107]
20mM Citronensäure in MeOH/H ₂ O (15:85 v/v); pH 2.5	MeOH/H ₂ O/HFO (50:50:1 v/v)	5.7 - 11.7	5	[59]
10mM NH ₄ Ac in ACN/H ₂ O (16:84 v/v); pH 9.8	0.1% NH ₃ in IPA/BGE (80:20 v/v)	8.0 - 12.0	5	[138]
50mM NH ₄ Ac; pH 7.5	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	1.4 - 6.2	6	[112]
25mM NH ₄ FO in ACN/MeOH (80:20 v/v) und 1M HFO	0.5% HFO in IPA/H ₂ O (50:50 v/v)	2.5 - 5.7	8	[9]
1M HFO; pH 1.8	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	1.4 - 8.6	10	[139]
20mM NH ₄ Ac; pH 6.84	ACN/20mM NH ₄ Ac in H ₂ O (50:50 v/v)	13.2 - 15.0	15	[140]
100mM NH ₄ FO; pH 2.4	0.1% HFO in IPA/H ₂ O (50:50 v/v)	4.5	21	[88]
10mM NH ₄ Ac; pH 4.0 oder 8.5	1% HAc in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	4.0 - 14.0	80	[46]
10mM NH ₄ Ac in HAc/H ₂ O (5:95 v/v); pH 3	entfällt	15.0	2	[141]
16mM NH ₄ FO in MeOH/H ₂ O (60:40 v/v); pH 4.5	MeOH/20mM HFO (75:25 v/v)	3.0 - 12.1	5	[108]
25mM NH ₄ Ac; pH 9	1% HFO in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	4.5 - 14.4	5	[71]
30mM NH ₄ FO; pH 3.5	MeOH/H ₂ O (95:5 v/v) mit 5mM NH ₄ FO	6.1	5	[142]
200mM NH ₄ FO in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v); pH 3.0	MeOH/10mM HAc (90:10 v/v)	2.0 - 5.0	6	[26]
40mM NH ₄ FO; pH 9.0	ACN	2.6 - 6.2	6	[143]
10mM NH ₄ Ac in HAc/H ₂ O (5:95 v/v); pH 3	entfällt	4.1 - 7.3	6	[141]
10mM NH ₄ Ac in HFO/H ₂ O (0.8:99.2 v/v) oder 20mM NH ₄ Ac; pH 8.0	0.1% HAc in IPA/H ₂ O / MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	4.5 - 11.4	6	[70]
10mM NH ₄ Ac in HFO/H ₂ O (0.8:99.2 v/v) oder 20mM NH ₄ Ac; pH 8.0	0.1% HAc in IPA/H ₂ O / MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	5.3 - 11.1	6	[70]
20mM NH ₄ Ac; pH 8.0	MeOH/BGE (75:25 v/v); pH 5.0 mit HFO	5.9 - 14.1	7	[86]
10mM NH ₄ Ac; pH 4.0 oder 8.5	1% HAc in IPA/H ₂ O (80:20 v/v)	3.0 - 4.0	25	[46]

	Analyt(-en)	Probenkonz.	IS (Konzentration)	Pol.	Analys.
A	Erythropoetin	1000 ppm	entfällt	+	TOF ⁷⁾
	Angiotensin I & II	10 ⁻⁴ M	entfällt	-	Q-q-TOF
	Standardpeptide	154 – 205 nM	entfällt	+	IT
	Insulin	100 µM	entfällt	+	IT
	Gonadorelin	25 µg/mL	entfällt	+	IT ¹⁾
	Angiotensin II	25 µg/mL	entfällt	+	IT ¹⁾
	Angiotensin I & II	10 ⁻⁶ M	entfällt	+	TQ
	basische Standardproteine	0.5 mg/mL	entfällt	+	IT
	Standardpeptide	20 µg/mL	entfällt	+	TQ ¹⁾
	Standardpeptide	0.1 µg/mL	entfällt	+	TQ ¹⁾
	Metabolomanalyse von B.subtilis	100 µmol/mL	entfällt	-	SQ
	Standardpeptide	80 ng/mL	entfällt	+	TQ ¹⁾
	Peptide	5 - 10 µg/mL	entfällt	+	TOF ¹⁾
	Substanz P	keine Angabe	entfällt	+	TQ
	Angiotensin II	25 µg/mL	entfällt	+	TQ ¹⁾
	Gonadorelin	25 µg/mL	entfällt	+	TQ ¹⁾
	Angiotensinvarianten	10 µg/mL	entfällt	+	IT ²⁾
	kurze Peptide	keine Angabe	entfällt	+	TQ / TOF
	Standardproteine	0.01 mg/mL	entfällt	+	TQ ¹⁾
	Peptide	46 - 80 µg/mL	entfällt	+	TOF
B	Metabolomanalyse von B.subtilis	keine Angabe	Methioninsulfon (0.056 µmol)	+	SQ
	Metabolomanalyse von B.subtilis	keine Angabe	PIPES (0.0056 µmol)	-	SQ
	Angiotensinvarianten	1 µM	AlIIH = Angiotensin (1 µM)	+	TOF ⁵⁾

Tab. 8-3: Methoden aus der Literatur zur Quantifizierung von Peptiden und Proteinen mit CE-MS. (A): Methoden ohne IS; (B): Methoden mit IS.

Eine Methode verwendet ⁷⁾ MALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization) zur Ionisierung der Probe.

Fortsetzung auf der gegenüberliegenden Seite.

8 Einordnung der experimentellen Ergebnisse

<i>Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten</i>	<i>Zusammensetzung des sheath liquid</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>n</i>	<i>Quelle</i>
0.01M Tricin, 0.01M NaCl, 0.01M NaAc, 7M Harnstoff, 2.5mM Putrescin; pH 5.5	entfällt	0.2 - 7.9	3	[144]
10mM NH ₄ Ac; pH 10.0	MeOH	2.8 ³⁾	3	[145]
100mM NH ₄ Ac; pH 3.0	MeOH/H ₂ O/HAc (50:49:1 v/v)	4.6 - 5.7	3	[146]
verschiedene BGE	ACN/H ₂ O/HFo (50:50:1 v/v)	<10.0	3	[41]
25mM HFo in MeOH/H ₂ O (5:95 v/v)	entfällt	4.4	4	[57]
25mM HFo in MeOH/H ₂ O (5:95 v/v)	entfällt	9.8	4	[57]
50mM NH ₄ Ac; pH 3.1	0.1% HFo in MeOH/H ₂ O (80:20 v/v)	3.4	5	[7]
75mM NH ₄ Ac; pH 5.5	0.05% HAc in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	< 5.0 ³⁾	5	[147]
100mM HFo	entfällt	5.6 - 12.1	5	[148]
100mM HFo	entfällt	6.1 - 13.2	5	[149]
50mM NH ₄ Ac; pH 9.0	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	0.9 - 5.4	6	[150]
25mM HFo in MeOH/H ₂ O (5:95 v/v); pH 2.3	entfällt	1.4 - 4.3	6	[116]
100mM HFo	entfällt	3.8 - 11.8 ³⁾	6	[151]
MeOH/H ₂ O/HFo (60:20:20)	MeOH/H ₂ O/HFo (60:20:20)	6.5	6	[37]
25mM HFo in MeOH/H ₂ O (5:95 v/v)	entfällt	7.8	8	[57]
25mM HFo in MeOH/H ₂ O (5:95 v/v)	entfällt	8.0	8	[57]
ε-Aminocaprinsäure/HAc; pH 4.4	1% (v/v) HAc in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	6.8 - 7.1	9	[152]
25mM NH ₄ Ac; pH 6.9	IPA/BGE (80:20 v/v)	1.9 - 9.0	10	[78]
0.5% Pharmalyte 3-10	entfällt	< 12.0	> 10	[153]
50mM HFo + 50mM HAc; pH 2.85 mit NH ₃	0.05% (v/v) HFo in IPA/H ₂ O (60:40 v/v)	9.0 - 15.0	36	[83]
1M HFo, pH 1.8	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	2.0 - 63.0	5	[154]
50mM NH ₄ Ac; pH 8.5 oder 7.5	5mM NH ₄ Ac in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	2.0 - 63.0	5	[154]
25mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10mM α-Cyano-4-hydroxymethylsäure in MeOH/H ₂ O (50:50 v/v)	entfällt	5.0 ³⁾	10	[155]

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präzision quantitativer Bestimmungen in der gekoppelten Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie beurteilt. Die verschiedenen Arten des verwendeten Internen Standards ermöglichten eine genauere Einordnung der Variationsquellen bei diesem analytischen Verfahren.

Weiterhin wurden die Auswirkungen von Variationen der Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten auf Migrationszeit, Signalintensität und deren Präzision untersucht und statistisch ausgewertet. Zusätzlich ist ein Leitfaden zur Methodenentwicklung für quantitative CE-MS entstanden, der auch eine umfassende Literatursammlung von Methoden und die bisher mit diesem analytischen System erreichten Präzisionen beinhaltet.

Die RSD%-Werte der absoluten Peakflächen liegen im Schnitt bei 7 – 25 %. Mit isotopenmarkiertem IS und mit einer Mehrfachinjektion des Analyten sind RSD% im Bereich von 2% möglich. Eine solche Präzision ist mit der von LC-MS Systemen vergleichbar, z.B. [46].

Die Untersuchung der Präzision mit verschiedenen IS lässt den Schluss zu, dass mindestens vier verschiedene Gruppen von Varianzkomponenten existieren, welche die Wiederholbarkeit von quantitativen CE-MS Bestimmungen mit einem sheath-flow Interface beeinflussen. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Ursachen, die bereits aus der CE-UV bekannt sind, wie beispielsweise Schwankungen des Injektionsvolumens oder Fehler bei der Probenvorbereitung (Kap. 5.3). Mit dem Einsatz eines IS werden Schwankungen, die von dieser Gruppe hervorgerufen werden, zum großen Teil eliminiert. Im Vergleich zu den drei anderen Gruppen für Varianzursachen spielt diese Gruppe nur eine untergeordnete Rolle.

Die Varianzursachen vom Typ „Kompensierbar 1“ (K1), „Nichtkompensierbar 1“ (NK1) und „nur isotopenmarkiert 1“ (NI1) haben ihren Ursprung in der Ionenquelle, also im Transfer von Ionen aus der flüssigen in die Gasphase.

Die zweite Gruppe von Variationsursachen (K1) beruht auf kurzfristigen Veränderungen des Ionisationsprozesses und kann durch die Verwendung eines IS kompensiert werden.

Bis zu einem gewissen Grad ist die zeitliche Nähe der Elution von Analyt und IS ein entscheidender Faktor zur Erhöhung der Präzision. Allerdings ist die Strukturgleichheit von Analyt und IS wichtiger als eine exakte Koelution, wie der Vergleich von isotopenmarkiertem IS und IS durch Mehrfachinjektion zeigt.

Das Ausmaß der dritten Gruppe von Auslösern von Variationen (NK1) ist zwar ebenfalls zeitabhängig, aber diese Schwankungen können nicht durch einen IS ausgeglichen werden.

Die absoluten Peakflächen unterliegen einer Kombination aus K1 und NK1, wobei der Anteil an K1 an der Gesamtvarianz in der Regel größer ist, wie an der erfolgreichen Senkung der RSD% der absoluten Peakflächen durch einen IS erkennbar ist. So kann die RSD% der Peakflächen von Paracetamol beispielsweise je nach der Intensität beider Gruppen von 9.2 – 42.5% schwanken (Tab. 7.3.1-1).

Nach der Quotientenbildung mit dem IS wird NK1 zur dominierenden Gruppe der Varianzursachen, da K1 je nach Art des IS in unterschiedlichem Ausmaß kompensiert wird. In den Phasen, in denen der Einfluss von NK1 gering ist, sind daher RSD% der Peakflächenquotienten unter 2% möglich. Liegen die RSD%-Werte bei 2%, ist die Präzision mit der von CE-UV-Methoden [22] vergleichbar. In diesem Fall können die Hauptursachen der Varianz nicht zwangsläufig in der Ionenquelle (besonders nicht im sheath-flow, wie häufig angenommen), sondern auch auf der CE-Seite, beispielsweise bei der Injektion, vermutet werden.

Bislang war es noch nicht möglich, genau zu bestimmen, wodurch oder in welchen Zyklen beide Gruppen auftreten. Ebenso ist die eindeutige Zuordnung von realen Einflussfaktoren zu den Gruppen K1 und NK1 noch nicht möglich.

Die vierte Gruppe (NI1) ist ein Spezialfall, der nur bei isotopenmarkiertem IS auftritt und auf der Interaktion von Analyt und IS im Elektrospraytropfen basiert. Diese Variationsursachen sollten in dem Konzentrationsbereich der ESI, in dem die Tropfenoberfläche noch nicht gesättigt ist, nur einen geringen Anteil an der Gesamtvarianz haben. Im Vergleich mit einem strukturverwandten IS ist der Anteil von NI1 an der Gesamtvarianz geringer als der Zuwachs von NK1 durch die unterschiedlichen Strukturen von Analyt und IS.

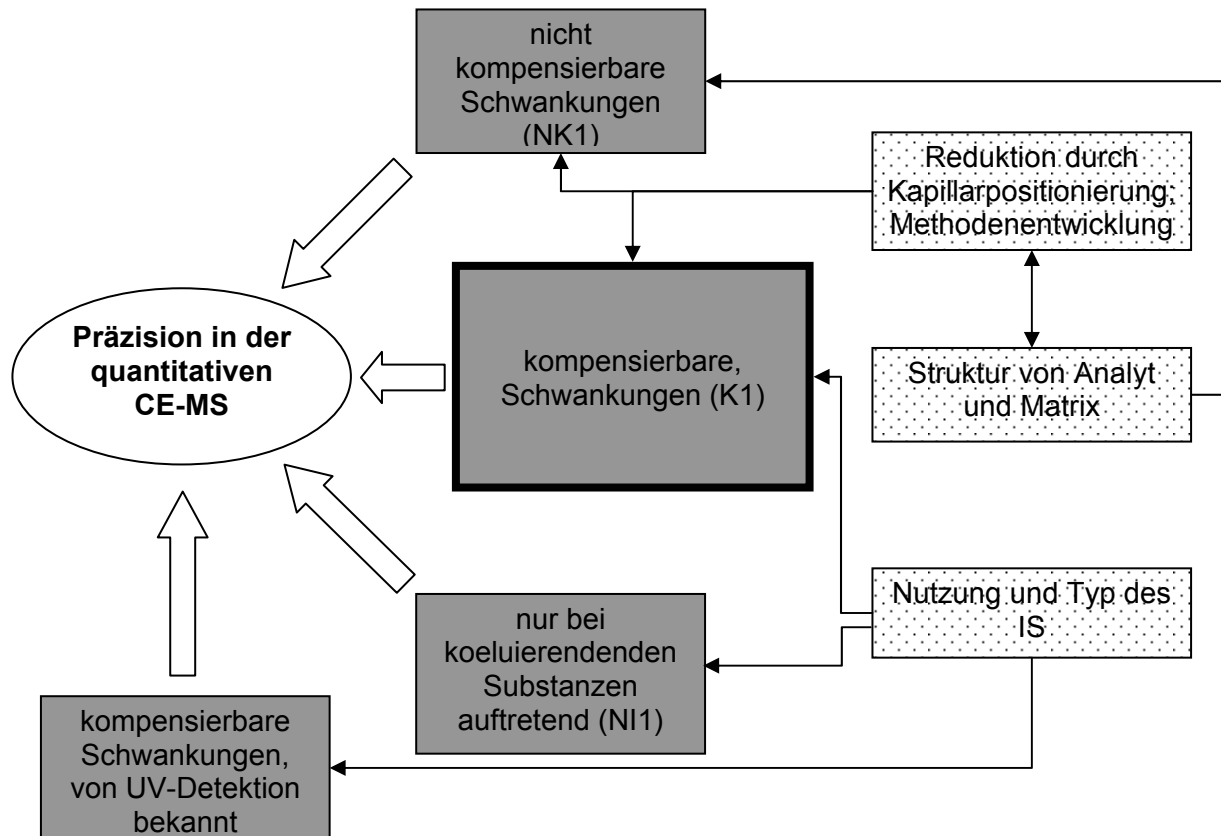


Abb. 9-1: Zusammenfassung der bisher erkannten Ursachen für Variationen. Außerdem sind Möglichkeiten zur Beeinflussung der Ursachen angegeben (rechts). Integrationsbedingte Variationen wurden nicht aufgenommen, da sie bei allen quantitativen instrumentellen Verfahren vorkommen.

Für die Methodenentwicklung bedeutet das, dass für einen Ausgleich der Varianzkomponenten ein Isotopomer des Analyten der geeignetste und universell einsetzbare IS ist. Gleiche Präzision, aber etwas schwierigere Anwendbarkeit und dementsprechend längere Methodenentwicklungszeit, bietet die Nachinjektion des zu quantifizierenden Analyten, wobei die Schwierigkeit darin besteht, eine möglichst kurze Differenz in den Migrationszeiten entstehen zu lassen und trotzdem eine Basislinientrennung zu erreichen. Strukturverwandte IS sind zur Zeit die am häufigsten eingesetzten IS, da sie leicht zu beschaffen sind. Allerdings ist die erreichbare Präzision etwas niedriger als mit den beiden davor genannten IS-Typen. Der strukturfremde IS bietet die geringste ausgleichende Wirkung, wobei angemerkt werden sollte, dass eine solche Kombination eher von theoretischer Bedeutung ist. In der Praxis wird normalerweise ein zumindest strukturverwandter IS eingesetzt.

Bei den Untersuchungen zur Präzision der absoluten Peakflächen konnte keine Korrelation zwischen den variierten Parametern des BGE (pH-Wert, Zugabe von

Isopropanol, Druck) und der Höhe der Präzision erkannt werden. Zu den Einflüssen dieser Parameter auf die Präzision der Peakflächenquotienten nach der Korrektur durch einen IS kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Bei der Datenauswertung wurde festgestellt, dass die Präzision der Signalintensität ebenfalls von der Präzision der Migrationszeit unabhängig ist.

In der CE-MS entsprechen die Auswirkungen von BGE-Variationen auf die Migrationszeit und ihre Präzision größtenteils denjenigen der CE mit UV-Detektion. Je alkalischer der BGE ist, desto stärker und stabiler ist der EOF und umso kürzer sind die beobachteten Migrationszeiten. Die Präzision der Migrationszeiten ist daher bei alkalischen BGE am höchsten. Die Zugabe von Isopropanol senkt die Leitfähigkeit und damit auch die Stärke und Stabilität des EOF. Im Unterschied zur CE mit konventioneller UV-Detektion wird die Präzision der Migrationszeit beim Einsatz eines sheath-flow Interface zusätzlich noch von der Flussrate des sheath liquid und des nebulizer gas beeinflusst. Die Einflüsse dieser Parameter wurden nicht untersucht, aber Literaturstellen von Untersuchungen genannt.

Die Peakfläche bei massenspektrometrischer Detektion ist von mehreren Faktoren abhängig. Die individuelle Ionisierbarkeit der Analytmoleküle aufgrund ihrer Struktur ist ein wichtiger Faktor, der durch die Wahl der Methodenparameter beeinflusst werden kann. Bei Analysen, die mehrere unterschiedliche Analyten enthalten, ist in der Regel ein Kompromiss bei der Wahl der Parameter notwendig. Dennoch bleibt ein schlecht ionisierbares Molekül in der Regel schlechter ionisierbar als ein leicht ionisierbares Molekül. So ist die resultierende Peakfläche von Neostigmin (273000 FE) ungefähr 7.5mal größer als von Nikotinsäure (36300 FE) gleicher Konzentration (Tab. 7.2.3-1: 0.2 mM; pH 8.5). Innerhalb gewisser Grenzen kann die Peakintensität optimiert werden, wie in Tabelle 7.3.1-2 gezeigt (z.B. Zuwachs der Peakfläche von Deuteroparacetamol um 102% bei der Zugabe von Isopropanol zum BGE). Einer der wichtigsten Punkte hierbei ist, auch im Hinblick auf die Wiederholbarkeit der Ergebnisse, die Position der Kapillare innerhalb des Interface, sowie die Schnittkante des Kapillarendes. Bei der Methodenentwicklung für quantitative CE-MS ist daher ein Positionierungsverfahren für die Kapillare und die sorgfältige Kontrolle der Kapillarenden unumgänglich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Möglichkeit der Kapillarpositionierung vorgestellt, die angewendet werden kann, ohne das Interface baulich zu verändern.

Weitere wichtige Faktoren, welche die Peakfläche beeinflussen und bei der Methodenentwicklung zu beachten sind, haben ihren Ursprung im sheath liquid. So muss die Zusammensetzung auf die zu untersuchenden Analyten abgestimmt werden, wobei Anteil und Art des organischen Lösemittels, Art und Konzentration des Elektrolyten, pH-Wert und die Flussrate des sheath liquid die zu variierenden Parameter sind.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, hat auch der BGE trotz seines geringen Anteils am versprühten Flüssigkeitsvolumen einen Einfluss auf die Signalintensität. Beim BGE haben, wie beim sheath liquid, die Wahl des pH-Werts und des organischen Lösemittels einen direkten Einfluss auf die Peakfläche. Eventuell trägt auch die Elutionsgeschwindigkeit, die ihrerseits vom pH-Wert und organischem Lösemittel abhängt, zur Ionisierungsausbeute bei. Die Auswirkungen von BGE-Komposition und angelegtem Druck sind in Tabelle 12.2-4 noch einmal aufgeführt. Die Konzentration der Hydroniumionen scheint für die Ionisierungseffizienz eine untergeordnete Rolle zu spielen, da auch die Peakfläche des Neostigmins von pH-Änderungen betroffen ist.

Viele Ursachen für Variationen in der quantitativen CE-MS liegen in der Einstellung des sheath-flow, beziehungsweise in seiner Zusammensetzung begründet, wie die höhere Präzision der LC oder die höhere Empfindlichkeit, die mit dem Einsatz eines sheathless Interface erreicht werden kann, zeigt. Dennoch ist die Verwendung eines sheath liquid Interface zur Zeit die beste Möglichkeit, den elektrischen Kontakt zwischen CE und MS herzustellen, da die Robustheit und Handhabbarkeit besser als die eines sheathless Interface ist. Neuentwicklungen wie das low-flow Interface [156] oder die Untersuchungen aus [49, 56] bzw. Berichten von [55, 157], bei denen das Mischverhältnis von sheath-flow und Fluss aus der Kapillare und die genaue Position der Kapillare im Interface untersucht wurden, könnten neue Ansatzpunkte zur Optimierung liefern.

10 Ausblick

Um den Einfluss der Elutionsgeschwindigkeit auf die Signalintensität zu beurteilen, sind verschiedene experimentelle Anordnungen denkbar. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung eines sheathless Interface, wobei die Problematiken dieser Interfacebauart, wie die geringe Robustheit und Abnutzung der stromleitenden Schicht neue Ursachen für Schwankungen in den Messungen hervorrufen könnten. Um die Probleme der Kopplung zweier Stromkreise zu umgehen, könnten Versuche mit der direkten Infusion der Probe mit Hilfe einer Nano-LC Pumpe gemacht werden. Der Nachteil der Ansätze mit einem sheathless Interface ist das Wegfallen des Einflusses des sheath-flow, so dass der Einsatz eines sheath-flow Interface sinnvoll ist. In diesen Fall besteht eine Möglichkeit zur Variation der Elutionsgeschwindigkeit unter Beibehaltung des BGE im Einsatz von Kapillaren unterschiedlichen Innendurchmessers.

Eine Wiederholung der Experimente mit isotoopenmarkiertem IS und den BGE, welche die größten und die kleinsten Signalintensitäten hervorgerufen haben (pH 4.0 mit 10% Isopropanol; pH 8.5), würde eine deutlichere Aussage über den Einfluss des BGE ermöglichen. Um den Faktor der Adduktbildung auszuschließen, sollte ebenfalls eine Messreihe mit Formiat als Elektrolyt und ansonsten gleichen Parametern untersucht werden.

Die Absenkung der Elektrolytkonzentration im sheath-flow könnte die Ionisierungsausbeute erhöhen und somit besonders bei der Nikotinsäure zu einer erhöhten Präzision führen.

Eine Variation der Zusammenstellung der Proben könnte die Ergebnisse der hier präsentierten Untersuchungen weiter erhärten.

So sind sowohl Atropin, als auch Neostigmin leichter als Ion in die Gasphase zu bringen als Paracetamol. Werden diese Substanzen mit ihren Isotopomeren als Probe II eingesetzt, sind die Variationskomponenten NK1 kleiner und die Unterschiede der RSD% in der absoluten Peakfläche müssten bei den verschiedenen BGE kleiner ausfallen. Dadurch würde eine deutlichere Aussage über die Streuungen der Peakflächenquotienten möglich.

Die Probe III sollte aus den drei Komponenten Neostigmin, Scopolamin (nach Optimierung des BGE) oder Atropin und N-Butylscopolamin (IS) neu zusammengesetzt werden. N-Butylscopolamin würde als IS gleichzeitig mehrere Anforderungen erfüllen: durch das quartäre Stickstoffatom liegt es immer als Kation vor, und seine Präzision wäre voraussichtlich mit der des Neostigminpeaks vergleichbar. Andererseits besteht die Möglichkeit, es durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Scopolamin oder Atropin als strukturverwandten IS zur weiteren Charakterisierung der Varianzursachen von Typ NK1 zu verwenden.

Experimente mit der Mehrfachinjektion desselben Analyten können detailliertere Aussagen zu den Ursachen der Varianz zulassen. So wären Versuche mit verschiedenen Abständen von Analyt und IS bei der näheren Beschreibung der Gruppe K1 hilfreich. Beispielhaft soll ein Vergleich von Probe I und Probe IV/V mit derselben Differenz der Migrationszeiten, der die Faktoren der unterschiedlichen Ionisierbarkeit der Moleküle ausschalten würde, genannt sein.

Zur weiteren praktischen Überprüfung der Einsatzmöglichkeiten der Mehrfachinjektion ist eine Änderung des Injektionsschemas zu einem definierten Abstand der einzelnen, basisliniengetrennten Peaks sinnvoll. Durch den definierten Abstand bei der Migration, selbst bei unterschiedlichen Analyten, wird die Beurteilung des BGE-Einflusses und der zeitlichen Gruppe der Variationsursachen K1 erleichtert.

Das natürliche Vorkommen von ^{13}C -Isotopen beträgt ungefähr 1%. Das würde bedeuten, dass beim Vorhandensein von zehn Kohlenstoffatomen im Molekül, 10% aller Substanzmoleküle ein ^{13}C -Isotop aufweisen. Bei der Bestimmung des linearen Bereichs der Ionisation oder der Konzentrationsabhängigkeit der Präzision kann bei einer solchen Substanz Aufwand bei der Probenvorbereitung und Messzeit gespart werden, indem das ^{13}C -Isotopomer anstelle der Probe mit der niedrigsten Konzentration mit vermessen wird.

Bei Analysen mit mehreren Komponenten ist es empfehlenswert, sich auf das Isotopomer eines Analyten zu beschränken, da die Empfindlichkeit des SIM-Modus mit steigender Anzahl an zu detektierenden Masse-Ladungs-Verhältnissen abnimmt.

11 Experimenteller Teil

11.1 Geräte und Software

- CE-Gerät ThermoQuest Spectraphoresis 1000 mit PC1000 Software 3.1 auf OS/2 Warp 4.0
- Bruker Daltronics EsquireLC Massenspektrometer mit Data Analysis 3.0 auf Windows NT
- Hewlett Packard ^{3D}CE, mit Hewlett Packard orthogonal ESI-Interface Kit
- Hewlett Packard Series 1100 MSD G1946A Single Quadrupol Massenspektrometer; beides gesteuert mit HP ChemStation Software (Rev. A.08.03 [847]) auf Windows NT
- Hewlett Packard Series 1100 Quant Pump G1311A mit Series 1100 Degasser und einem 1:100 Splitter zur Zuführung des sheath liquid
- Zur Integration: ChemStation Software (Rev. A.09.03 [1417]) und KISS auf Windows XP

- Metrohm 632 pH-Meter mit 6.0233.100 Glaselektrode
- Eppendorfpipetten: Eppendorf 20 – 200 µL und Roth 200 – 1000 µL
- Ultraschallbad: Bandelin Souorex RK 102
- Waage: Satorius 2001 MP2

11.2 Vorbereitung der Kapillaren

Die verwendeten Kapillaren stammten von Polymicro (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Hauptsächlich wurden Kapillaren mit einem Durchmesser von 50 µm verwendet (Polymicro TSP 050375). Die Kapillaren lagen als Meterware vor und mussten daher vor der Verwendung auf eine passende Länge gebracht werden. Dazu wurde die Kapillare mit einem Keramikplättchen abgeschnitten und die Qualität der Schnittkante mit einer Stereolupe überprüft. Bei Versuchen mit dem Spectraphoresis-Gerät betrug die Kapillarlänge 42 cm, die effektive Kapillarlänge 7 cm weniger. Bei der CE-MS Kopplung wurde eine Gesamtkapillarlänge von 90 cm verwendet und um einen Vergleich der MS-Ergebnisse mit UV zu ermöglichen,

wurde nach 23.5 cm ein Detektionsfenster in die Polyimidschicht gebrannt. Dazu wurde die Polyimidschicht auf 2 - 3 mm entweder mit einem Plasmabrenner oder einem elektrisch beheizten Draht verbrannt und die entstandenen Russpartikel mit Methanol entfernt. Auf dieselbe Art wurden die Enden der Kapillare behandelt.

Nach den Vorversuchen zur Äquilibration (Kap. 7.1.3) wurde bei der CE-MS folgende Standardmethode zur Konditionierung und Äquilibration eingesetzt:

- I. 2 Minuten mit dem später verwendeten BGE spülen (30 °C)
- II. 55 Minuten mit 1 M Natriumhydroxidlösung spülen (30 °C)
- III. 20 Minuten mit dem später verwendeten BGE spülen (30 °C)

Um eine Natriumkontamination des Massenspektrometers zu vermeiden, wurde die Kapillare während des Äquilibration nicht in das Interface, sondern auf ein Zellstofftuch geführt. Dadurch war das üblicherweise im Anschluss an die Spülprozedur folgende Anlegen der später verwendeten Trennungsspannung nicht möglich, da der Stromkreis nicht geschlossen war. Wie in Kapitel 7.1.3 zu den Vorversuchen dargestellt, hatte diese Änderung keine Auswirkung auf die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten, und somit auch nicht auf die Stärke des EOF.

Um die Kapillarposition bei einem Wechsel des BGE nicht zu verändern, wurde in diesem Fall auf eine Konditionierung der Kapillare verzichtet und nur eine Äquilibration durchgeführt. Dazu wurde die Kapillare für 50 min bei 30 °C mit dem später verwendeten BGE gespült. Auch dieses Verfahren zeigte keine Nachteile im Vergleich zur konventionellen Konditionierung und Äquilibration.

11.3 Herstellung des sheath liquid

Zur Herstellung des sheath liquid wurden Isopropanol (100%) und Wasser im Verhältnis 80:20 (v/v) gemischt. Dieser Mischung wurde dann 1% (v/v) Eisessig zugesetzt. Auf eine pH-Wert Bestimmung wurde wegen des geringen Wasseranteils verzichtet. Im Verlauf der Vorversuche wurden auch andere Zusammensetzungen des sheath liquid untersucht (Kap. 7.1.4), die aber nach demselben Verfahren hergestellt wurden.

11.4 Herstellung des Hintergrundelektrolyten

Da der pH-Wert des BGE einen unmittelbaren Einfluss auf die Mobilitäten von EOF und Analyten hat, ist eine sorgfältige und reproduzierbare Herstellung unverzichtbar [25].

Bei der Herstellung der BGE wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter, ausgestattet mit einer Glaselektrode, eingestellt. Vor jeder Verwendung wurde das pH-Meter mit Hilfe von Kalibrierstandards neu kalibriert. Zur Einstellung von pH 7.0 wurde der Standard aus 0.88 g getrocknetem (1.5 h, 110 °C) KH_2PO_4 und 1.82 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1.5 h, 110 °C) in 250.0 mL destilliertem Wasser hergestellt. Sollte ein saurer BGE hergestellt werden, wurde eine Kalibrierlösung aus 2.55 g getrocknetem Kaliumhydrogenphthalat in 250.0 mL destilliertem Wasser mit einem resultierenden pH-Wert von 4.0 verwendet. Zur Herstellung alkalischer BGE wurde ein Kalibrierstandard aus 0.95 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in 250.0 mL destilliertem Wasser mit einem pH-Wert von 9.23 eingesetzt. Alternativ wurden kommerziell erhältliche, IUPAC konforme Kalibrierlösungen der Firma Radiometer Analytical benutzt.

Zur Herstellung der BGE wurde die Masse an Ammoniumacetat oder -formiat, die der späteren nominellen Konzentration des BGE entspricht, in ca. der Hälfte des benötigten Totalvolumens Wasser in einem Becherglas gelöst. Anschließend folgte die Einstellung des gewünschten pH-Werts mit Ameisensäure, Essigsäure oder Ammoniaklösung. Dazu wurden alle zur pH-Wert-Einstellung verwendeten Reagenzien vor der Zugabe mit ungefähr dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Auf diese Weise ist die Reaktion der Bildung von Ammoniumacetat oder -formiat weniger heftig. Die Flüssigkeit wurde anschließend quantitativ in einen Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Bei BGE, die Isopropanol enthielten, wurde das benötigte Volumen Isopropanol separat abgemessen und nach der Einstellung des pH-Wertes zugegeben. Beim Auffüllen des Messkolbens ist die Volumenkontraktion von Alkohol/Wasser-Mischungen vernachlässigt worden, so dass der reale Gehalt an Isopropanol nicht dem nominellen Wert entspricht. Auf diese Weise war eine reproduzierbare Herstellung möglich.

Durch dieses Herstellungsverfahren entspricht nur die Konzentration einer Komponente des BGE der deklarierten Konzentration. In sauren BGE ist die

Ammoniumkonzentration korrekt, in alkalischen Puffern stimmt die Konzentration des Salzes der verwendeten Säure.

Alle BGE wurden nach der Herstellung für 5 Minuten im Ultraschallbad und vor der Verwendung im CE-Gerät erneut entgast.

Substanz	Hersteller	Best.-Nr.
Ammoniumacetat	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Germany)	16988
Ammoniak in Wasser 25%	Sigma-Aldridge (St. Louis, MO, USA)	09860
Essigsäure 100%	Sigma-Aldridge (St. Louis, MO, USA)	33209
Isopropanol	Sigma-Aldridge (St. Louis, MO, USA)	59304
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck AG (Darmstadt, Germany)	1.04871
Kaliumhydrogenphthalat	Merck AG (Darmstadt, Germany)	1.02400
Dinatriumhydrogenphosphat·2 H ₂ O	Merck AG (Darmstadt, Germany)	1.06576
Natriumtetraborat·10 H ₂ O	Merck AG (Darmstadt, Germany)	1.06308
Natriumhydroxid-Lösung 1 mol/L	Merck AG (Darmstadt, Germany)	1.09913
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck AG (Darmstadt, Germany)	1.06495
Wasser	Milli-Q system „academic A10“ (Millipore, Bedford, MA) oder Bidestillation	
IUPAC zertifizierter Standardpuffer pH 4.005 bei 25 °C	Radiometer Analytical (Villeurbanne, France)	S11M002
IUPAC zertifizierter Standardpuffer pH 7.000 bei 25 °C	Radiometer Analytical (Villeurbanne, France)	S11M004
IUPAC zertifizierter Standardpuffer pH 9.180 bei 25 °C	Radiometer Analytical (Villeurbanne, France)	S11M006

Tab. 11.4-1: Reagenzien, die zur Herstellung von sheath liquid und BGE verwendet wurden.

11.5 Herstellung der Proben

11.5.1 Probe I: Strukturfremder Interner Standard

Diese Probe basiert auf der Gerätetestprobe aus [93, 94] und enthält Neostigminbromid, Paracetamol und Nikotinsäure. Zur Herstellung wurde von jeder Substanz die 0.2 mmol entsprechende Masse separat eingewogen und quantitativ in einen 100.0 mL Messkolben überführt, welcher anschließend mit destilliertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt wurde, so dass eine 2.0 mM Lösung entstand. Ein Teil dieser Lösung wurde dann mit Wasser auf eine Konzentration von 0.2 mM verdünnt. Zur Herstellung der 0.02 mM Lösung wurde dieser Schritt dann mit der 0.2 mM Lösung wiederholt.

11.5.2 Probe II: Isotopenmarkierter Interner Standard

In dieser Probe diente d₄-Paracetamol als IS für Paracetamol. Da der IS in Ampullen, die jeweils 1 mL Lösungen von 100 µg d₄-Paracetamol in Methanol enthielten, geliefert wurde, unterschied sich das Herstellungsverfahren von denen der anderen Proben. Aus diesem Grund ist bei Probe II die Massenkonzentration und nicht wie sonst üblich die Stoffmengenkonzentration angegeben. Von einer Lösung aus 20 mg Paracetamol in 100.0 mL Wasser wurde 1.0 mL abgenommen und 2.0 mL der d₄-Paracetamol-Lösung (entspricht zwei Ampullen) in einem 10 mL Messkolben gemischt, der anschließend mit Wasser bis zur Eichmarke gefüllt wurde, so dass sich eine endgültige Konzentration pro Isotopomer von 20 µg/mL (entspricht 0.132 mM Paracetamol und 0.129 mM d₄-Paracetamol) ergab. Wie die Ergebnisse der Versuche mit Probe III zeigen, hat der Methanolanteil in dieser Probe (ca. 20 %) keinen Einfluss auf die Peakgröße und die Präzision.

11.5.3 Probe III: Strukturverwandter Interner Standard

Zur Bestimmung des Einflusses strukturverwandter IS wurden die 0.1 mmol entsprechenden Massen Neostigminbromid, Cetylpyridiniumchlorid, Atropinsulfat-Monohydrat und Scopolaminhydrobromid-Trihydrat separat eingewogen und zusammen in einem 100.0 mL Messkolben in Wasser gelöst. Jeweils 1.0 mL dieser Stammlösung wurde in separaten 10.0 mL Messkolben mit 1.0 mL Acetonitril, Methanol, Isopropanol oder Wasser vermischt. Durch das Auffüllen mit Wasser bis zur Eichmarke ergab sich eine Konzentration von je 0.1 mM pro Analyt.

11.5.4 Probe IV & V: Mehrfache Injektion desselben Analyten

Die Konzentration dieser Proben lag bei 0.2 mM in Wasser. Zur Herstellung wurde jeweils die 0.2 mmol äquivalente Masse Neostigminbromid, Paracetamol oder Nikotinsäure separat in 100.0 mL Wasser gelöst. Je 1.0 mL der drei resultierenden Lösungen wurde mit Wasser in verschiedenen Messkolben auf 10.0 mL verdünnt.

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Acetonitril	Merck AG (Darmstadt, Germany)	100030
Atropinsulfat·H ₂ O	Synopharm (Barsbüttel, Germany)	109540-0004
Cetylpyridiniumchlorid·H ₂ O	Sigma-Aldridge (St. Louis, MO, USA)	C0732
Methanol	Merck AG (Darmstadt, Germany)	106007
Neostigminbromid	Sigma-Aldridge (St. Louis, MO, USA)	N2001
Nikotinsäure	Merck AG (Darmstadt, Germany)	500005
Paracetamol	Synopharm (Barsbüttel, Germany)	700117-003
d ₄ -Paracetamol	Cerilliant (Round Rock, TX, USA)	P-909
Scopolaminhydrobromid·3 H ₂ O	Sigma-Aldridge (St. Louis, MO, USA)	S1875

Tab. 11.5-1: Reagenzien zur Probenherstellung, deren Hersteller, sowie die Bestellnummer.

11.6 Methoden

11.6.1 Spectrophoresis 1000 mit UV-Detektion

In allen Methoden:

- Gerät: ThermoQuest Spectrophoresis 1000
- Kapillare: unbeschichtete Kieselglaskapillare, Innendurchmesser: 50 µm; eff. Länge: 35 cm
- BGE: Ammoniumacetat oder -formiat mit unterschiedlichen pH-Werten und Zusatz organischer Lösemittel
- Trennungsspannung: +25 kV normale Polung (Injektion auf der Anodenseite, Detektion auf der Kathodenseite)
- ramp-time: 9 Sekunden
- Maximale Stromstärke: 120 µA
- Trenntemperatur: 25 °C
- Detektion: $\lambda = 214 \text{ nm}$ und $\lambda = 254 \text{ nm}$
- Um eine gleich hohe Füllung der BGE- und Probengefäße zu gewährleisten, wurde an allen Gefäßen eine Füllhöhenmarkierung angebracht

Äquilibration mit Natriumhydroxidlösung:

- Prewash: 1M Natriumhydroxidlösung für 15 min bei 50 °C
- Dauer des Stromflusses: 60 min bei 25 °C
- Postwash: BGE für 5 min bei 30 °C

Äquilibration ohne Natriumhydroxidlösung:

- Prewash: Ammoniaklösung (pH 12.6) oder BGE für 15 min bei 50 °C
- Dauer des Stromflusses: 60 min bei 25 °C
- Postwash: BGE für 5 min bei 30 °C

Versuche zur BGE-Entwicklung:

- Prewash: BGE für 2 min bei 25 °C
- Dauer des Stromflusses: 60 min bei 25 °C
- Injektionsdauer der Probe: hydrodynamisch, unterschiedliche Dauer bei 0.75 psi

Methode	Äquilibration mit Natriumhydroxidlösung	Äquilibration ohne NaOH-Lösung	BGE-Entwicklung
Gerät	Spectraphoresis 1000, nur UV-Detektion		
Kapillare	unbeschichtete Kieselglaskap., Innendurchmesser: 50 µm; eff. Länge: 35 cm		
BGE	Ammoniumacetat oder -format mit unterschiedlichen pH-Werten und unterschiedlichem Zusatz organischer Lösemittel		
Trennungsspannung [kV]	+25	+25	+25
(Dauer [min])	(60.0)	(60.0)	(vom BGE abhängig)
ramp-time [s]	9	9	9
max. Stromstärke [µA]	120	120	120
Trenntemperatur [°C]	25	25	25
Detektion [nm]	---	---	214, 254
Prewash	1 M NaOH-Lsg.	Ammoniaklsg. / BGE	BGE
(Dauer [min]; Temp.[°C])	(15.0; 50)	(15.0; 50)	(2.0; 25)
Postwash	BGE	BGE	---
(Dauer [min]; Temp.[°C])	(5.0; 30)	(5.0; 30)	---
Injektionsdauer [s]	---	---	unterschiedlich
(Druck [psi])	---	---	(0.75)

Tab. 11.6.1-1: Zusammenfassende Tabelle der Methodenparameter auf dem Spectraphoresis 1000 Gerät.

11.6.2 Hewlett Packard ^{3D}CE mit UV-Detektion und Hewlett Packard Series 1100 MSD G1946A Single Quadrupol Massenspektrometer

Die verwendeten CE-MS Methoden unterschieden sich nur in der Dauer und Höhe des angelegten Drucks bei der Injektion und den Analysezeiten, die in Abhängigkeit vom BGE verändert wurden. Weitere Geräteparameter wurden nicht verändert, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit von Trennungen und Detektion zu gewährleisten.

In allen Methoden:

- Gerät: Hewlett Packard ^{3D}CE
- Kapillare: unbeschichtete Kieselglaskapillare, Innendurchmesser: 50 µm; eff. Länge: bei UV-Detektion: 23.5 cm; bei MS-Detektion: 90.0 cm
- BGE: Ammoniumacetat mit pH-Werten 4.0 oder 8.5 optional 10% Isopropanol
- Trenntemperatur: 25 °C, ca. 35 cm der Kapillare waren nicht temperiert
- Um eine gleich hohe Füllung der Probengefäße zu erreichen, wurde an den Gefäßen eine Füllhöhenmarkierung angebracht
- Nach jeder Trennung: Erneuerung des BGE auf der Einlassseite

- Gerät: Hewlett Packard Series 1100 Quant Pump G1311A mit Series 1100 Degasser
- Flussrate: 0.3 mL/min, mit 1:100 Splitter auf 3 µL/min reduziert
- sheath liquid: Isopropanol/Wasser (80:20 v/v), 1% Eisessig

- Gerät: Hewlett Packard Series 1100 MSD G1946A
- nebulizer gas: Stickstoff mit 10 psi Druck
- Trocknungsgas: Stickstoff mit einer Flussrate von 6 L/min bei 200 °C
- Sprayspannung: -4000 V
- Detektion: positiver Ionenmodus
- Fragmentor: 35 V

Äquilibration:

- Prewash: BGE für 2 min bei 30 °C
- 1M Natriumhydroxidlösung für 55 min bei 30 °C
- Keine Spannung angelegt
- Postwash: BGE für 20 min bei 30 °C

Spülschritte bei Pufferwechsel:

- BGE für 50 min bei 30 °C

Versuche zur Präzisionsbestimmung:

- Prewash: BGE für 2 min bei 25 °C
- Trennungsspannung: +25 kV normale Polung (Injektion auf der Anodenseite, Detektion auf der Kathodenseite)
- ramp-time: 15 Sekunden
- Dauer des Stromflusses: abhängig vom BGE bei 25 °C: 8 – 30 Minuten
- Maximale Stromstärke: 50 µA
- Injektionsdauer: siehe Tabelle 11.6.2-1
- UV-Detektion: $\lambda = 214 \text{ nm}$ und bei einigen Messreihen $\lambda = 254 \text{ nm}$ (Bandbreite: 20 nm)
- MS-Detektion: in Abhängigkeit von der Probe SIM auf: m/z: 124, 152, 223, 229, 304; bei isotoopenmarkierten Internen Standard: Massenscan von m/z 150 - 160

Methode	Ä	S	I	II	III	IV	V
Gerät	Hewlett Packard ^{3D} CE						
Kapillare	unbeschichtete Kieselglaskapillare, Innendurchmesser: 50 µm; eff. Länge: bei UV-Detektion: 23.5 cm; bei MS-Detektion: 90.0 cm						
BGE	Ammoniumacetat pH 4.0 oder 8.5 optional 10% Isopropanol						
Trennungsspannung [kV] (Dauer[min])	---	---	+25 (BGE abh.)	+25 (BGE abh.)	+25 (BGE abh.)	+25 (BGE abh.)	+25 (BGE abh.)
ramp-time [s]	---	---	15	15	15	15	15
max. Stromstärke [µA]	---	---	50	50	50	50	50
Trenntemperatur [°C]	30	30	25	25	25	25	25
UV-Detektion [nm]	---	---	214 (254)	214 (254)	214 (254)	214 (254)	214 (254)
Prewash (Dauer [min]; Temp.[°C])	BGE (2.0; 30)	---	BGE (2.0; 25)	BGE (2.0; 25)	BGE (2.0; 25)	BGE (2.0; 25)	BGE (2.0; 25)
Spülschritt (Dauer [min]; Temp.[°C])	1 M NaOH- Lsg (55; 30)	BGE (50.0; 30)	---	---	---	---	---
Postwash (Dauer [min]; Temp.[°C])	BGE (20.0; 30)	---	---	---	---	---	---
Probeninjektion							
Dauer [s]	---	---	9	9	3	9	9
Druck [mbar]	---	---	35	35	25	35	35
BGE-Injektion nach der Probe							
Dauer [s]	---	---	3	3	---	3	3
Druck [mbar]	---	---	35	35	---	35	35
Dauer [s]	---	---	---	---	---	60	40
Druck [mbar]	---	---	---	---	---	35	35
Druck während der Trennung [mbar]	0	0	0	0 oder 15	0, 5, 10 oder 25	0	0
Methode	Ä	S	I	II	III	IV	V

Tab. 11.6.2-1: Parameter kapillarelektrophoretischer Trennung. Ä: Äquilibration, S: Spülprozedur bei Pufferwechsel, I: strukturfremder IS, II: isotopenmarkierter IS, III: strukturverwandter IS, IV: gleicher IS durch Mehrfachinjektion (Neostigmin), V: gleicher IS durch Mehrfachinjektion (Paracetamol, Nikotinsäure). Injektionsfolge bei den Proben IV und V: Probe, BGE (Gefäß 1), BGE (Gefäß 2). Diese Abfolge wurde fünfmal wiederholt, wobei im letzten Durchlauf die BGE-Injektion aus Gefäß 2 entfiel. Eine Erklärung für das Injektionsschema der Proben IV und V findet sich in Kap. 6.1.

Methode	Ä	S	I	II	III	IV	V
Gerät	Hewlett Packard Series 1100 Quant Pump G1311A mit Series 1100 Degasser						
sheath liquid	Isopropanol/Wasser (80:20 v/v), 1% Eisessig						
Flussrate	0.3 mL/min, mit 1:100 Splitter auf 3 µL/min reduziert						
nebulizer gas	Stickstoff mit 10 psi Druck						
Gerät	Hewlett Packard Series 1100 MSD G1946A						
Trocknungsgas	Stickstoff mit einer Flussrate von 6 L/min bei 200 °C						
Sprayspannung [V]	-4000						
Ionenmodus	+						
Fragmentor [V]	35						
Analysatormodus	---	---	SIM	Scan	SIM	SIM	SIM
Detektionsbereich [m/z]	---	---	124, 152, 223	150-160	223, 229, 304	223	124 o. 152
Methode	Ä	S	I	II	III	IV	V

Tab. 11.6.2-2 Parameter am Interface und am Massenspektrometer. Ä: Äquilibration, S: Spülprozedur bei Pufferwechseln, I: strukturfremder IS, II: isotopenmarkierter IS, III: strukturverwandter IS, IV: gleicher IS durch Mehrfachinjektion (Neostigmin), V: gleicher IS durch Mehrfachinjektion (Paracetamol, Nikotinsäure).

11.7 Positionierung der Kapillare

11.7.1 In der Kapillarkassette

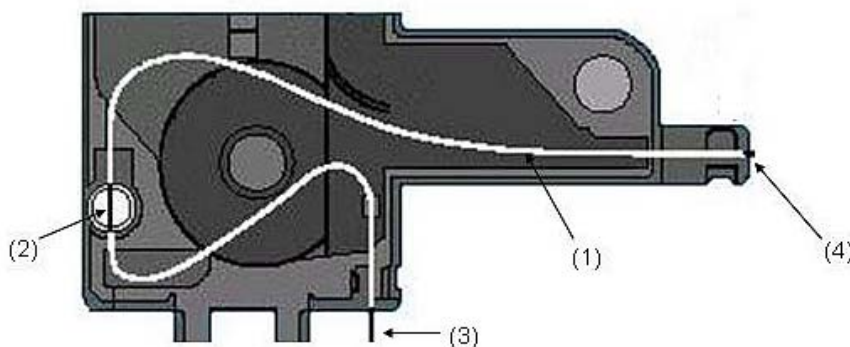


Abb. 11.7.1-1 (Quelle: Agilent Technologies): Verlauf der Kapillare (1) vom Puffergefäß (3) durch das Detektorfenster für UV-Detektion (2) zum ESI-Interface (4). Wird die Kapillare auf diese Weise eingesetzt, kommt es häufig zu Kapillarbrüchen aufgrund der hohen Spannung der Kapillare.

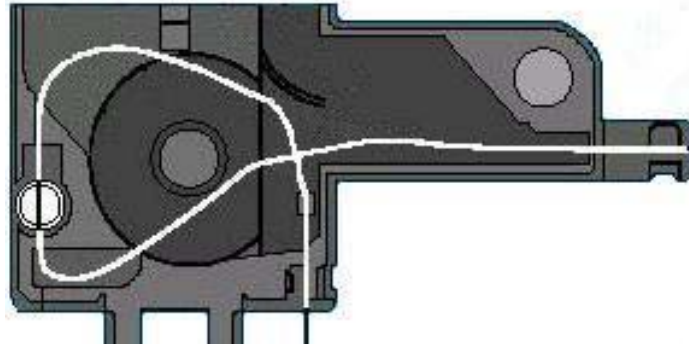


Abb. 11.7.1-2: Eine Alternative zu dem von Hersteller empfohlenen Verlauf (Abb. 11.7.1-1) der Kapillare in der Kassette, bei dem die Spannung der Kapillare wesentlich reduziert ist. Theoretisch kann es an der Stelle, an der sich die Kapillare überlappt zu einer erhöhten Temperatur kommen, in der Praxis wurden aber keine negativen Auswirkungen beobachtet. Bei allen Versuchen wurde die Kapillare wie hier gezeigt verwendet.

11.7.2 Im Interface

Um die Kapillare reproduzierbar mit Hilfe der Intensität des aus dem Neostigminübertrag resultierenden Signals im Interface zu positionieren, wurde folgendes Verfahren entwickelt und eingesetzt. Zur Erzeugung des Probenübertrags wurde in eine frisch äquilibrierte und konditionierte Kapillare eine neostigminhaltige Probe (0.2 mM Probe I) injiziert (9 s; 35 mbar). Ohne weitere Analyse wurde die Kapillare anschließend 2 min mit BGE gespült, danach BGE anstelle der Probelösung injiziert (9 s; 35 mbar) und Spannung (+25 kV) angelegt. Das Signal des von den Kapillarwänden desorbierenden Neostigmins wurde unter Beobachtung der Echtzeitanzeige des Massenspektrometers mit Hilfe der Kapillarpositionierungsschraube des Interfaces auf eine vorher definierte Intensität (ca. 700 Impulse) gebracht.

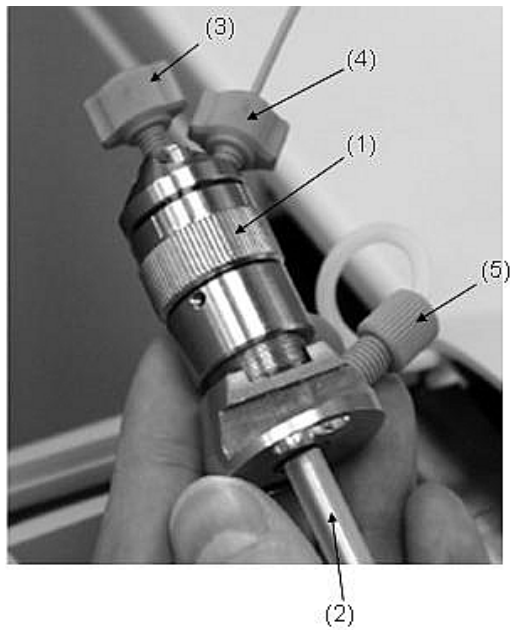
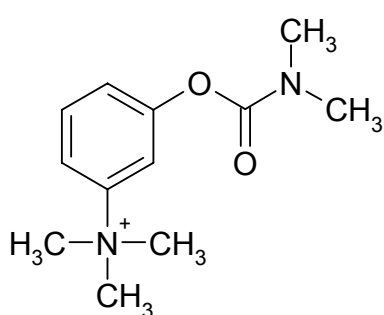
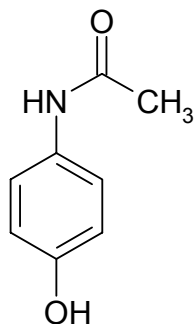


Abb. 11.7.2-1 (Quelle: Agilent Technologies): In dieser Arbeit wurde die von der Firma Agilent angebotene Version des „coaxial sheath liquid interface“ verwendet. Das Foto zeigt den zur Kapillarpositionierung benötigten Teil der Sprayereinheit. Durch Drehen des geriffelten Rings (1) in der Mitte lässt sich die Kapillarspitze in der im unteren Viertel des Bildes erkennbaren Stahlröhre (2) auf- und abbewegen. (3): Verbindung zur CE; (4): Leitung für das sheath liquid; (5): Leitung für das nebulizer gas.

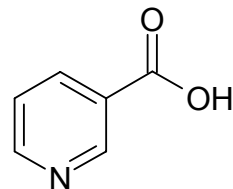
12 Anhang



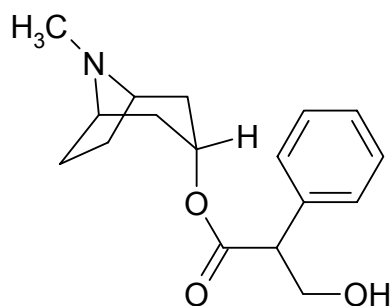
(I)



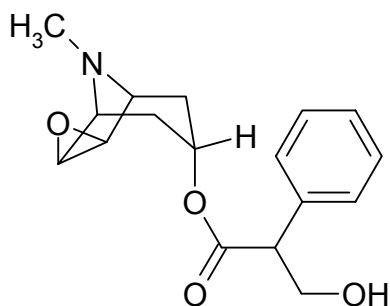
(II)



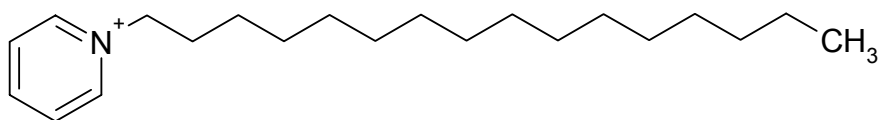
(III)



(IV)



(V)



(IV)

Abb. 12-1: Strukturformeln von Neostigmin (I), Paracetamol (II), Nikotinsäure (III), Atropin (IV), Scopolamin (V) und Cetylpyridinium (IV). Bei d_4 -Paracetamol sind die vier Wasserstoffatome am Aromaten durch Deuteriumatome ersetzt.

Substanz	Summenformel	M_r [g/mol]	m/z	pK_{A_1}	pK_{A_2}	IP
Atropinsulfat·H ₂ O	C ₃₄ H ₄₈ N ₂ O ₁₀ S·H ₂ O	694.83	290	9.2 – 9.4	---	---
Cetylpyridiniumchlorid·H ₂ O	C ₂₁ H ₃₈ ClN·H ₂ O	358.01	305	---	---	---
Neostigminbromid	C ₁₂ H ₁₉ BrN ₂ O ₂	303.20	223	---	---	---
Nikotinsäure	C ₆ H ₅ NO ₂	123.11	124	2.1	4.8	3.4
Paracetamol	C ₈ H ₉ NO ₂	151.17	152	9.0 – 9.5	---	---
d ₄ -Paracetamol	C ₈ H ₅ D ₄ NO ₂	155.13	156	9.0 – 9.5	---	---
Scopolamin·HBr·3H ₂ O	C ₁₇ H ₂₂ BrNO ₄ ·3H ₂ O	402.29	304	8.1	---	---

Tab. 12-1: Summenformel, Massen und pK_A -Werte der eingesetzten Substanzen. Bei der Angabe m/z handelt es sich um das im positiven Ionenmodus detektierte Masse-Ladungs-Verhältnis, (IP: isoelektrischer Punkt); Quellen der pK_A -Werte: [158-160]

12.1 Pharmakologischer Hintergrund und Hinweise zum Umgang mit den verwendeten Substanzen

Atropin und Scopolamin sind Tropanalkaloide und werden bei peroraler Gabe gut resorbiert. Sie können die Blut-Hirnschranke und Plazenta passieren. Beide Moleküle binden bevorzugt an die muscarinergen Acetylcholinrezeptoren und wirken in therapeutischen Dosen parasympholytisch. Dies zeigt sich in der Spasmolyse der glatten Muskulatur, z.B. im Magen-Darm-Trakt oder im Auge, der Sekretionseinschränkung exokriner Drüsen und somit Erhöhung der Körpertemperatur, Tachykardie und Unterdrückung von Erbrechen. In geringerer Konzentration wirken sie zentral erregend, bei Überdosierung (ab ca. 100 mg) zentral lähmend und können zum Tode durch Atemstillstand führen. Beim Abwiegen dieser Substanzen sind daher unbedingt Handschuhe zu tragen. Vergiftungen werden einerseits symptomatisch (Kühlen der Person, Magenspülung) oder durch die Gabe des indirekten Parasympathomimetikums Physostigmin behandelt [158].

Neostigmin ist ein synthetisches Analogon zu Physostigmin (Indolalkaloid), ist aber im Unterschied zu letzterem nicht ZNS-gängig. Als indirekte Parasympathomimetika hemmen sie die Acetylcholinesterase reversibel. So führen Überdosierungen (ab 60 mg per oral tödlich) zu Übelkeit, Bradykardie, Krämpfen der Skelettmuskulatur und Bronchospasmen. Als Antidot kann Atropinsulfat gegeben werden [95]. Bei der Verwendung sind dieselben Vorsichtsmaßnahmen zu beachten wie bei den Tropanalkaloiden.

Paracetamol ist erst ab einer Aufnahme von 10-15 g akut toxisch [159], so dass von den hier verwendeten Dosierungen keine Gefährdungen zu erwarten sind. Von

Cetylpyridiniumchlorid und Nikotinsäure ist bekannt, dass sie bei Hautkontakt Allergien auslösen können, so dass beim Einwiegen Handschuhe zu tragen sind.

12.2 Übersichtstabellen

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
Position	A											
BGE	pH 4.0											
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02					
Neostigmin	1900000	25.5	49	384000	15.3	58	86800	14.3	59			
Paracetamol	411000	44.2	59	82900	21.1	58	10900	22.1	58			
Nikotinsäure	155000	59.4	47	30500	26.4	58	777	54.8	58			
In Tabelle	7.2.3-1 / 7.2.3-2			7.2.3-1 / 7.2.3-2 / 7.3.3-2 / 7.3.5-2 / 7.5.2-3			7.2.3-1 / 7.2.3-2					
BGE	pH 8.5											
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02					
Neostigmin	1210000	18.7	60	273000	9.57	60	72000	17.1	60			
Paracetamol	299000	25.7	60	75200	14.1	60	12500	25.3	60			
Nikotinsäure	196000	26.8	60	36300	22.7	60	282	56.4	33			
In Tabelle	7.2.3-1 / 7.2.3-2			7.2.3-1 / 7.2.3-2 / 7.3.3-2 / 7.3.5-2 / 7.5.2-3			7.2.3-1 / 7.2.3-2					
Position	B											
BGE	pH 8.5											
Probenkonz. [mM]	2.0						0.2					
Neostigmin	1200000	17.3	99	363000	12.4	98	373000	9.71	100			
Paracetamol	237000	13.0	99	46900	13.1	98	44500	15.4	100			
Nikotinsäure	147000	14.0	91	15900	11.7	96	14900	15.8	100			
In Tabelle	7.2.1-2 / 7.2.3-3 / 7.2.5-1			7.2.1-1 / 7.2.2-1 / 7.2.3-3 / 7.2.6-2			7.2.1-1 / 7.2.5-1					
Position	C											
BGE	pH 4.0											
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02					
Neostigmin	1700000	16.0	102	330000	7.48	101	76600	20.8	100			
Paracetamol	301000	18.7	99	46800	11.2	99	4110	13.1	100			
Nikotinsäure	153000	14.0	34	20000	12.3	84	1690	21.0	69			
In Tabelle	7.2.3-3 / 7.2.5-1			7.2.3-3 / 7.2.5-1 / 7.2.6-1			7.2.5-1					
Position	D											
BGE	pH 4.0 10% Isopropanol											
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02					
Neostigmin	4239000	30.6	71	555000	25.2	94	105000	48.6	96			
Paracetamol	861000	17.4	49	148000	23.4	84	34600	62.6	96			
Nikotinsäure	411000	23.6	11	61000	26.2	44	2300	59.8	84			
In Tabelle	7.2.4-1			7.2.4-1			7.2.4-1					

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
Position	E											
BGE	pH 8.5; 10% Isopropanol											
Probenkonz. [mM]	2.0			0.2			0.02					
Neostigmin	2290000	50.1	92	923000	20.5	88	174000	38.1	63	133000	40.5	16
Paracetamol	888000	43.9	94	356000	24.9	90	49000	63.5	65	48000	43.5	16
Nikotinsäure	556000	45.1	77	170000	29.7	88	24000	73.2	59	27000	64.0	16
In Tabelle	7.2.4-1			7.2.4-1			7.2.4-1			keine		
Position	F			G			H					
BGE	pH 8.5			pH 8.5			pH 8.5					
Probenkonz. [mM]	0.02			0.02			0.02					
Neostigmin	440000	29.6	15	191000	31.5	46	130000	36.3	50			
Paracetamol	54000	41.1	15	19000	36.3	46	15500	34.6	50			
Nikotinsäure	25000	50.5	13	7800	46.2	44	6400	38.8	50			
In Tabelle	keine			keine			keine					

Tab. 12.2-1: Zur besseren Gesamtübersicht werden alle Untersuchungen mit strukturfremden IS nach der Kapillarposition sortiert noch einmal aufgelistet.

	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n	Peakfläche	RSD [%]	n
BGE	4.0												8.5					
	2.0																	
	A			C			A			B								
	1900000	25.5	49	1680000	16.0	102	1210000	18.7	60	1200000	17.3	99						
	411000	44.2	59	301000	18.7	99	299000	25.7	60	237000	13.0	99						
	155000	59.4	57	153000	14.0	34	196000	26.8	60	147000	14.0	91						
	0.2																	
	A			C			A			B								
	384000	15.3	58	334000	7.77	101	273000	9.57	60	363000	12.4	98	373000	9.71	100			
	82900	21.1	58	46800	11.2	99	75200	14.1	60	46900	13.1	98	44500	15.4	100			
	30500	26.4	58	19900	12.3	84	36300	22.7	60	15900	11.7	96	14900	15.8	100			
		0.02																
A			C			A			F			G			H			
86800		14.3	59	76600	20.8	100	72000	17.1	60	440000	29.6	15	191000	31.5	46	130000	36.3	50
10900		22.1	58	4110	13.1	100	12500	25.3	60	54000	41.1	15	19000	36.3	46	15500	34.6	50
777		54.8	58	1690	21.0	69	282	56.4	33	25000	50.5	13	7800	46.2	44	6400	38.8	50
BGE		pH 4.0; 10% Isopropanol												pH 8.5; 10% Isopropanol				
	2.0																	
	D						E											
	4239000	30.6	71				2290000	50.1	92									
	861000	17.4	49				888000	43.9	94									
	411000	23.6	11				556000	45.1	77									
	0.2																	
	D						E											
	555000	25.2	94				923000	20.5	88									
	148000	23.4	84				356000	24.9	90									
	61000	26.2	44				170000	29.7	88									
D						E												
105000		48.6	96				174000	38.1	63	133000	40.5	16						
34600		62.6	96				49000	63.5	65	48000	43.5	16						
2300		59.8	84				24000	73.2	59	27000	64.0	16						

Tab. 12.2-2: Die Daten aus Tabelle 12.2-1 nach Konzentration der Probe sortiert.

BGE	Lösemittelzusatz	Wasser									
	Druck [mbar]	0		5		10		25		0 - 25	
Analyt		Peakfläche	RSD [%]	Peakfläche	RSD [%]	Peakfläche	RSD [%]	Peakfläche	RSD [%]	Peakfläche	RSD [%]
pH 4.0	Neostigmin	441000	2.05	468000	3.30	481000	5.99	469000	7.31	465000	5.19
	Atropin	148000	2.93	172000	7.61	180000	9.09	178000	8.31	169000	7.67
	Scopolamin	317000	6.85	257000	25.2	355000	13.2	416000	11.1	336000	14.1
pH 4.0; 10% Isopropanol	Neostigmin	422000	1.79	495000	4.04	499000	2.91	413000	5.56	457000	3.81
	Atropin	114000	4.73	134000	6.49	142000	5.26	121000	4.41	128000	5.38
pH 8.5	Neostigmin	473000	4.16	460000	12.6	431000	5.07	395000	2.06	440000	7.46
	Atropin	196000	2.14	191000	12.4	181000	3.96	164000	6.20	183000	7.40
pH 8.5; 10% Isopropanol	Neostigmin	503000	6.33	486000	6.35	498000	12.2	478000	2.51	491000	7.77
	Atropin	191000	7.00	175000	5.09	182000	3.45	193000	2.81	185000	4.88
Lösemittelzusatz		Acetonitril									
pH 4.0	Neostigmin	485000	8.54	504000	7.90	435000	3.17	432000	4.08	464000	6.64
	Atropin	180000	9.14	186000	11.2	160000	2.05	165000	4.78	173000	8.06
	Scopolamin	410000	9.23	425000	8.94	400000	10.3	347000	8.72	395000	9.36
pH 4.0; 10% Isopropanol	Neostigmin	447000	4.11	439000	5.79	484000	6.50	424000	5.71	449000	5.64
	Atropin	134000	3.08	129000	4.79	144000	4.07	121000	11.2	132000	6.28
pH 8.5	Neostigmin	527000	14.5	524000	12.0	527000	4.74	466000	8.59	511000	10.6
	Atropin	222000	14.1	248000	11.4	246000	4.97	217000	13.7	233000	11.4
pH 8.5; 10% Isopropanol	Neostigmin	519000	5.62	470000	8.61	441000	1.52	452000	1.40	471000	5.39
	Atropin	197000	7.86	164000	7.56	159000	2.51	179000	6.12	175000	6.58
Lösemittelzusatz		Isopropanol									
pH 4.0	Neostigmin	403000	6.74	423000	4.42	514000	9.54	443000	2.92	446000	6.78
	Atropin	144000	8.73	156000	2.77	213000	12.7	178000	2.85	173000	8.85
	Scopolamin	303000	22.4	280000	15.9	350000	19.2	258000	7.43	298000	18.0
pH 4.0; 10% Isopropanol	Neostigmin	386000	4.00	358000	2.70	355000	9.23	395000	5.20	374000	5.72
	Atropin	120000	7.28	110000	8.83	112000	8.03	110000	10.5	113000	8.69

pH 8.5	Neostigmin	235000	31.0	137635.93	20.4	147039.51	37.1	73025.15	19.4	148168.62	32.7
	Atropin	104000	41.8	50918.10	15.4	54685.85	24.2	29771.63	23.6	59740.95	39.1
pH 8.5; 10% Isopropanol	Neostigmin	412000	7.89	385534.78	1.35	365384.97	6.32	353890.76	4.98	379188.83	5.79
	Atropin	150000	11.2	144861.66	6.21	137435.63	9.56	127378.35	10.7	139986.39	9.60
pH 4.0	Lösemittelzusatz	Methanol									
	Neostigmin	465000	5.48	509000	9.22	505000	12.0	454000	13.4	483000	10.5
pH 4.0; 10% Isopropanol	Atropin	176000	9.83	188000	10.7	197000	13.6	175000	9.39	184000	11.2
	Scopolamin	330000	6.55	391000	10.4	341000	23.4	219000	9.58	320000	14.8
pH 8.5	Neostigmin	450000	7.58	417000	10.1	405000	4.75	361000	16.8	408000	10.2
	Atropin	136000	6.19	122000	7.50	122000	12.0	109000	23.2	122000	13.0
pH 8.5; 10% Isopropanol	Neostigmin	239000	47.0	21500	39.1	88000	43.3	177000	32.5	180000	43.5
	Atropin	88000	57.7	76000	46.9	34000	33.6	68000	34.8	66000	50.8
pH 4.0	Neostigmin	474000	2.73	400000	4.44	416000	6.09	415000	7.81	426000	5.47
	Atropin	169000	3.19	142000	1.08	169000	6.13	164000	8.47	161000	5.65
pH 4.0	Lösemittelzusatz	Mittelwert aus allen Zusätzen									
	Neostigmin	448000	6.29	476000	6.95	484000	8.71	449000	8.16	465000	10.5
pH 4.0; 10% Isopropanol	Atropin	162000	8.43	176000	9.13	188000	11.1	174000	6.90	175000	11.2
	Scopolamin	340000	12.3	338000	14.2	361000	16.8	310000	9.99	337000	14.8
pH 8.5	Neostigmin	426000	4.97	427000	6.31	436000	5.90	398000	9.14	422000	10.2
	Atropin	126000	5.52	124000	6.90	130000	7.53	115000	13.6	124000	13.0
pH 8.5; 10% Isopropanol	Neostigmin	368000	21.1	334000	18.5	298000	12.5	278000	12.7	320000	43.5
	Atropin	1524000	24.3	141000	18.3	129000	8.72	120000	16.3	136000	50.8
	Neostigmin	477000	5.83	435000	6.22	430000	7.25	424000	4.63	442000	5.47
	Atropin	177000	7.65	157000	5.69	162000	4.94	166000	6.92	165000	5.65

Tab. 12.2-3: Aufschlüsselung der Ergebnisse von Probe III nach angelegtem Druck und Art des zugesetzten Lösemittels.

<i>Parameter</i>		<i>Probe I</i>	<i>Probe II</i>	<i>Probe III</i>	<i>Probe IV + V</i>
Migrationszeit absolut	pH-Wert	ja (7.2.7-1 / 7.2.7-2)	ja (7.3.6-1)	-	ja (Text)
	Isopropanol	ja (7.2.7-2)	n. eindeutig (7.3.6-1)	-	ja (Text)
	Druck	-	nein (7.3.6-1)	ja (Abb. 7.4.2-3)	-
Präzision	pH-Wert	ja (7.2.7-1 / 7.2.7-2)	ja (7.3.6-1)	-	ja (Text)
	Isopropanol	ja (7.2.7-2)	n. eindeutig (7.3.6-1)	-	ja (Text)
	Druck	-	ja (7.3.6-1)	nein (7.4.2-1)	-
Signalintensität absolut	pH-Wert	nicht eindeutig (7.2.3-1)	ja (7.3.1-1)	ja (7.4.3-1)	ja (7.5.2-1)
	Isopropanol	nicht eindeutig (7.2.3-1)	ja (7.3.1-1)	n. eindeutig (7.4.3-1)	ja (7.5.2-1)
	Druck	-	ja (7.3.5-2)	nein (Abb. 7.4.2-2)	-
Präzision	pH-Wert	nicht eindeutig (7.2.3-2)	nein (7.3.2-1)	nein (7.4.3-1)	nein (7.5.2-1)
	Isopropanol	¹⁾ (7.2.4-1)	nein (7.3.2-1)	nein (7.4.3-1)	ja (7.5.2-1)
	Druck	-	ja (7.3.5-2)	nein (7.4.2-1)	-
Präzision nach IS Korrektur	pH-Wert	nicht eindeutig (7.2.3-1)	ja (7.3.5-1)	ja (7.4.3-1)	n. eindeutig (7.5.2-1)
	Isopropanol	¹⁾ (7.2.4-1)	ja (7.3.5-1)	n. eindeutig (7.4.3-1)	n. eindeutig (7.5.2-1)
	Druck	-	ja (7.3.5-2)	-	-

Tab. 12.2-4: Zusammenfassung der Auswirkungen von BGE-Variationen und Druck auf Migrationszeit und Signalintensität. Zusätzlich sind die Tabellen mit den Originaldaten angegeben. ¹⁾: ein Vergleich ist wegen unterschiedlicher Kapillarpositionen nicht ratsam. Die Ziffern in den Klammern sind die Tabellennummern.

13 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Jens Ohnesorge
Geburtsdatum: 17. Mai 1974
Geburtsort: Mainz
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang:

seit 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig
2002 / 2003	Forschungsaufenthalt in der Abteilung für analytische Entwicklung von AstraZeneca R&D in Södertälje, Schweden
2000 - 2003	Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik
2000	Approbation als Apotheker
1999 – 2000	zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung: „Rudolf Apotheke“ in Braunschweig (Inh.: H.-J. Domanetzki)
1999	erster Abschnitt der praktischen Ausbildung: „Salutas Pharma GmbH“ in der Abteilung für Galenische Entwicklung
1998	wiss. Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Technologie

Hochschulstudium:

1994 – 1999	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
-------------	--

Zivildienst:

1993 – 1994	Lebenshilfe Braunschweig
-------------	--------------------------

Schulausbildung:

1986 – 1993	Lessinggymnasium Braunschweig – Wenden
1984 – 1986	Orientierungsstufe Wenden
1980 – 1984	Grundschule Wenden

14 Literaturverzeichnis

- [1] Jorgenson, J.W. und Lukacs, K.D., *Anal. Chem.* **1981**, 53, (8), 1298-1302.
- [2] Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D. und Alice, M.A., *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240.
- [3] Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, J.B. und Fenn, J.B., *Anal. Chem.* **1985**, 57, 675-679.
- [4] Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R. und Smith, R.D., *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1230-1232.
- [5] Smith, R.D., Barinaga, C.J. und Udseth, H.R., *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1948-1952.
- [6] Willems, A.V., Deforce, D.L., Peteghem, C.H.V. und Bocxlaer, J.F.V., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1221-1253.
- [7] Liu, C.C., Alary, J.-F., Vollmerhaus, P. und Kadkhodayan, M., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1366-1375.
- [8] McCourt, J., Bordin, G. und Rodriguez, A.R., *J. Chromatogr. A* **2003**, 990, 259-269.
- [9] Geiser, L., Cherkaoui, S. und Veuthey, J.-L., *J. Chromatogr. A* **2000**, 895, 111-121.
- [10] Vuorensola, K., Kokkonen, J., Sirén, H. und Ketola, R.A., *Electrophoresis* **2001**, 22, 4347-4354.
- [11] Larsson, M., Sundberg, R. und Folestad, S., *J. Chromatogr. A* **2001**, 934, 75-85.
- [12] Zheng, J., Jann, M.W., Honm, Y.Y. und Shamsi, S.A., *Electrophoresis* **2004**, 25, 2033-2043.
- [13] Hempel, G., *Electrophoresis* **2000**, 21, 691-698.
- [14] Kenndler, E.: In: Khaledi, M.G.: *High Performance Capillary Electrophoresis - Theory, Techniques, and Applications*. **1998**, 1.Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York/ Chinchester/ Weinheim/ Brisbane/ Singapore/ Toronto, 146, 25-76.
- [15] Rupprecht, H., *Pharm. Zeitung* **1975**, 120, (35), 1265-1273.
- [16] Huang, T.-L., Tsai, P., Wu, C.-T. und Lee, C.S., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2887-2893.
- [17] Schwer, C. und Kenndler, E., *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1801-1807.
- [18] Neugebauer, M.: In: Rücker, G.: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. **2001**, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 386-487.
- [19] Altria, K.D.: In: Altria, K.D.: *Capillary Electrophoresis Guidebook - Principles, Operation, and Applications*. **1996**, 1.Edition, Humana Press, Totowa, 52, 3-15.
- [20] Schomburg, G.: In: Khaledi, M.G.: *High Performance Capillary Electrophoresis - Theory, Techniques, and Applications*. **1998**, 1.Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York/ Chinchester/ Weinheim/ Brisbane/ Singapore/ Toronto, 146, 481-524.
- [21] Porras, S.P., Riekkola, M.-L. und Kenndler, E., *Electrophoresis* **2001**, 22, 3798-3804.
- [22] Wätzig, H., Degenhardt, M. und Kunkel, A., *Electrophoresis* **1998**, 19, 2695-2752.

- [23] Friedl, W. und Kenndler, E., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2003-2009.
- [24] Chien, R.-L.: In: Khaledi, M.G.: *High Performance Capillary Electrophoresis - Theory, Techniques, and Applications*. **1998**, 1.Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York/ Chinchester/ Weinheim/ Brisbane/ Singapore/ Toronto, 146, 449-480.
- [25] Mayer, B.X., *J. Chromatogr. A* **2001**, 907, 21-37.
- [26] Nunez, O., Moyano, E. und Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* **2002**, 974, 243–255.
- [27] Kebarle, P. und Tang, L., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 972A-986A.
- [28] Cole, R.B., *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 763-772.
- [29] Enke, C.G., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4885-4893.
- [30] Zhou, S. und Cook, K.D., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2001**, 12, 206-214.
- [31] Taflin, D.C., Ward, T.L. und Davis, E.J., *Langmuir* **1989**, 5, 376-384.
- [32] Kebarle, P., *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 804-817.
- [33] Loscertales, I.G. und Mora, J.F.d.l., *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, (12), 5041-5060.
- [34] Smith, R.D., Sheng, Y. und Tang, K., *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 269-278.
- [35] Gaskell, S.J., *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 677-688.
- [36] Bruins, A.P., *J. Chromatogr. A* **1998**, 794, 345-357.
- [37] Katayama, H., Yoda, Y.I. und Asakawa, N., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 1167-1178.
- [38] King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. und Olah, T., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2000**, 11, 942-950.
- [39] Kebarle, P. und Peschke, M., *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 11-35.
- [40] Cech, N.B. und Enke, C.G., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2717-2723.
- [41] Eriksson, J.H.C., Mol, R., Somsen, G.W., Hinrichs, W.L.J., Frijlink, H.W. und de Jong, G.J., *Electrophoresis* **2004**, 25, 43-49.
- [42] Emmert, J., Pfluger, M. und Wahl, F., *LC GC Eur.* **2004**, (12), 646-649.
- [43] Skoog, D.S. und J.J.Leary: *Instrumentelle Analytik*. **1996**, 4th Edition, Axel Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [44] G.Rücker: In: Rücker, G.: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. **2001**, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 386-487.
- [45] Barceló-Barrachina, E., Moyano, E. und Galceran, M.T., *Electrophoresis* **2004**, 25, 1927–1948.
- [46] Ohnesorge, J., Sängers-van de Griend, C. und Wätzig, H., *Electrophoresis* **2005**, 26, 2360-2375.
- [47] Constantopoulos, T.L., Jackson, G.S. und Enke, C.G., *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 37-52.
- [48] Tang, L. und Kebarle, P., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3654-3668.
- [49] Ross, G.A., *LC GC Eur.* **2001**, (01), 2-6.
- [50] Schmitt-Kopplin, P. und Frommberger, M., *Electrophoresis* **2003**, 24, 3837-3867.
- [51] Tang, F.P.W., Leung, G.N.W. und Wan, T.S.M., *Electrophoresis* **2001**, 22, 2201-2209.
- [52] Brocke, A.v., Nicholson, G. und Bayer, E., *Electrophoresis* **2001**, 22, 1251–1266.
- [53] Moini, M., *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 466-480.
- [54] Simó, C., Barbas, C. und Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1306-1318.
- [55] Simpson, D.C. und Smith, R.D., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1291-1305.
- [56] Nilsson, S.L., Bylund, D., Jörntén-Karlsson, M., Petersson, P. und Markides, K.E., *Electrophoresis* **2004**, 25, 2100-2107.

- [57] Waterval, J.C.M., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A.J.R., Bult, A., Lingeman, H. und Underberg, W.J.M., *Electrophoresis* **2001**, 21, 2701–2708.
- [58] Chen, Y.-R., Tseng, M.-C., Chang, Y.-Z. und Her, G.-R., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 503–508.
- [59] McClean, S., O’Kane, E.J. und Smyth, W.F., *Electrophoresis* **2000**, 21, 1381–1389.
- [60] Hagberg, J., *J. Chromatogr. A* **2003**, 988, 127–133.
- [61] <http://www.ich.org>
- [62] Wätzig, H. und Ermer, J., *PZ Prisma* **2003**, 10, 257.
- [63] *Pharm. Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk* **2002**, 75–80.
- [64] H.Wätzig: In: Nürnberg, E. und Surmann, P.: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 2*. **1991**, 5th Edition, Springer, Berlin/ Heidelberg/ New York, 1048–1084.
- [65] Altria, K.D. und Fabre, H., *Chromatographia* **1995**, 40, 313–320.
- [66] Liu, R.H., Lin, D.-L., Chang, W.-T., Liu, C., Tsay, W.-I., Li, J.-H. und Kuo, T.-L., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 619A–626A.
- [67] Hettiarachchi, K. und Cheung, A.P., *J. Chromatogr. A* **1995**, 717, 191–202.
- [68] Stokvis, E., Rosing, H., López-Lázaro, L., Schellens, J.H.M. und Beijnen, J.H., *Biomed. Chromatogr.* **2004**, 18, 400–402.
- [69] Kindt, E.K., Kurzyniec, S., Wang, S.-C., Kilby, G. und Rossi, D.T., *J. Pharm. Biomed. Analysis* **2003**, 32, 893–904.
- [70] Heinig, K. und Henion, J., *J. Chromatogr. B* **1999**, 735, 171–188.
- [71] Wey, A.B. und Thormann, W., *J. Chromatogr. B* **2001**, 770, 191–205.
- [72] Hilder, E.F., Klampfl, C.W., Buchberger, W. und Haddad, P.R., *Electrophoresis* **2002**, 23, 414–420.
- [73] Steiner, F. und Hassel, F., *Electrophoresis* **2000**, 21, 3994–4016.
- [74] Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3865–3883.
- [75] Klampfl, C.W. und Ahrer, W., *Electrophoresis* **2001**, 22, 1579–1584.
- [76] Ohnesorge, J., Neusüß, C. und Wätzig, H., *Electrophoresis* **2005**, 26, im Druck.
- [77] Siethoff, C., Nigge, W. und Linscheid, M., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1357–1361.
- [78] Hau, J. und Roberts, M., *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3977–3984.
- [79] Cech, N.B. und Enke, C.G., *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, 20, 362–387.
- [80] Matysik, F.-M., *Electrophoresis* **2002**, 23, 400–407.
- [81] Feng, H.-T., Yuan, L.L. und Li, S.F.Y., *J. Chromatogr. A* **2003**, 1014, 83–91.
- [82] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.Á., García-Montelongo, F.J. und Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2004**, 25, 2065–2076.
- [83] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Balaguer, E. und Barbosa, J., *Electrophoresis* **2003**, 24, 883–891.
- [84] Temesi, D. und Law, B., *LC GC Int.* **1999**, March, 175–180.
- [85] Foret, F., Thompson, T.J., Vouros, P. und Karger, B.L., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4450–4458.
- [86] Huikko, K. und Kostianen, R., *J. Chromatogr. A* **2000**, 872, 289–298.
- [87] Huikko, K., Kotiaho, T. und R.Kostianen, *Rapid Commun. Mass Spec.* **2002**, 16, 1562–1568.
- [88] Geiser, L., Rudaz, S. und Veuthey, J.-L., *Electrophoresis* **2003**, 24, 3049–3056.
- [89] Rodriguez, R., Manes, J. und Pico, Y., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 452–459.
- [90] Simó, C., Cottet, H., Vayaboury, W., Giani, O., Pelzing, M. und Cifuentes, A., *Anal. Chem.* **2004**, (76), 335–344.
- [91] Schepers, U., Ermer, J., Preu, L. und Wätzig, H., *J. Chromatogr. B* **2004**, 810, 111–118.

- [92] Lloyd, D.K. und Wätzig, H., *J. Chromatogr.* **1995**, 663, 400-405.
- [93] Wätzig, H. und Dette, C., *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, 345, 403-410.
- [94] Kunkel, A., Degenhardt, M., Schirm, B. und Wätzig, H., *J. Chromatogr. A* **1997**, 768, 17-27.
- [95] Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G. und Wichtl, M.: In: *Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe Kommentar für Studierende*. **1991**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, N53.
- [96] <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjfrbn/buffers/makebuf.asp>
- [97] Bauer, K.H., Frömming, K.-H. und Führer, C.: In: *Pharmazeutische Technologie*. **1997**, GOVI Verlag, Frankfurt, 36-101.
- [98] Baur, L., Sängler-van de Griend, C. und Wätzig, H., *J. Chromatogr. A* **2002**, 979, 97-103.
- [99] Altria, K.D. und Fabre, H., *Chromatographia* **1995**, 40, 313-320.
- [100] Lafont, F., Aramendia, M.A., Garcia, I., Borau, V., César Jiménez, Marinas, J.M. und Urbano, F.J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 562-567.
- [101] Heitmeier, S. und Blaschke, G., *J. Chromatogr. B* **1999**, 721, 93-108.
- [102] Taylor, R.B., Toasaksiri, S. und Reid, R.G., *J. Chromatogr. A* **1998**, 798, 335-343.
- [103] Buchberger, W. und Schöftner, R., *Electrophoresis* **2003**, 24, 2111-2118.
- [104] Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P. und Veuthey, J.-L., *Electrophoresis* **1999**, 20, 3402-3409.
- [105] Hind, A.R., Bhargava, S.K. und Cullis, P.G., *Anal. Chim. Acta* **1998**, 377, 39-45.
- [106] Vrouwe, E.X., Gysler, J., Tjaden, U.R. und van der Greef, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 1682-1688.
- [107] Cherkaoui, S., Rudaz, S., Varesio, E. und Veuthey, J.-L., *Electrophoresis* **2001**, 22, 3308-3315.
- [108] Sentellas, S., Moyano, E., Puignou, L. und Galceran, M.T., *Electrophoresis* **2003**, 24, 3075-3082.
- [109] Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. und Aebersold, R., *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 994-999.
- [110] Zhou, S. und Cook, K.D., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2000**, 11, 961-966.
- [111] Macià, A., Borrull, F., Calull, M. und Aguilar, C., *Electrophoresis* **2004**, 25, 3441-3449.
- [112] Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matsuda, K., Tomita, M. und Nishioka, T., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6224-6229.
- [113] Cao, P. und Moini, M., *Electrophoresis* **1998**, 19, 2200-2206.
- [114] Gottardo, R., Bortolotti, F., Maristella Trettene, Paoli, G.D. und Tagliaro, F., *J. Chromatogr. A* **2004**, 1051, 207-211.
- [115] Morrison, D., Davies, A.E. und Watt, A.P., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1896-1902.
- [116] Waterval, J.C.M., Hommels, G., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A.J.R., Bult, A., Lingeman, H. und Underberg, W.J.M., *Electrophoresis* **2001**, 22, 2709-2716.
- [117] Huck, C.W., Stecher, G., Ahner, W., Stöggli, W.M., Buchberger, W. und Bonna, G.K., *J. Sep. Sci.* **2002**, 25, 904-908.
- [118] Takeda, S., Fukushima, K., Chayamac, K., Nakayamad, Y., Tanaka, Y. und Wakida, S.-i., *J. Chromatogr. A* **2004**, 1051, 297-301.
- [119] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.Á., García-Montelongo, F.J. und Cifuentes, A., *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 948-956.
- [120] Cook, H.A., Klampfl, C.W. und Buchberger, W., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1576-1583.

- [121] Carter, S.J., Li, X.-F., Mackey, J.R., Modi, S., Hanson, J. und Dovichi, N.J., *Electrophoresis* **2001**, 22, 2730–2736.
- [122] Boatto, G., Nieddu, M., Carta, A., Pau, A., Palomba, M., Asproni, B. und Cerri, R., *J. Chromatogr. B* **2005**, 814, 93–98.
- [123] Sawada, H. und Nogami, C., *Anal. Chim. Acta* **2004**, 507, 191–198.
- [124] Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., Benedetto, G.D., Kettrup, A. und Cataldi, T.R.I., *Electrophoresis* **2002**, 23, 2904–2912.
- [125] Rodriguez, R., Pico, Y., Font, G. und Manes, J., *J. Chromatogr. A* **2002**, 949, 359–366.
- [126] Qin, W. und Li, S.A.Y., *Electrophoresis* **2002**, 23, 4110–4116.
- [127] Chang, S.Y. und Yeung, E.S., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2251–2257.
- [128] Vanhoenacker, G., l'Escaille, F.d., Keukeleire, D.D. und Sandra, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 34, 595–606.
- [129] Vanhoenacker, G., l'Escaille, F.d., Keukeleire, D.D. und Sandra, P., *J. Chromatogr. B* **2004**, 799, 323–330.
- [130] Soga, T. und Heiger, D.N., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1236–1241.
- [131] Juan-García, A., Font, G. und Picó, Y., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1550–1561.
- [132] Goodwin, L., Startin, J.R., Keely, B.J. und Goodall, D.M., *J. Chromatogr. A* **2003**, 1004, 107–119.
- [133] Safarpour, H., Asiaie, R. und Katz, S., *J. Chromatogr. A* **2004**, 1036, 217–222.
- [134] Toussaint, B., Palmer, M., Chiap, P., Hubert, P. und Crommen, J., *Electrophoresis* **2001**, 22, 1363–1372.
- [135] Zhao, J.-Y., Thibault, P., Tazawa, T. und Quilliam, M.A., *J. Chromatogr. A* **1997**, 781, 555–564.
- [136] Iio, R., Chinaka, S., Tanaka, S., Takayama, N. und Hayakawa, K., *Analyst* **2003**, 128, 646–650.
- [137] Sato, S., Soga, T., Nishioka, T. und Tomita, M., *Plant J.* **2004**, 40, 151–163.
- [138] Riu, J. und Barcello, D., *Analyst* **2001**, 126, 825–828.
- [139] Soga, T., Kakazu, Y., Robert, M., Tomita, M. und Nishioka, T., *Electrophoresis* **2004**, 25, 1964–1972.
- [140] Keski-Hyönilä, H., Raanaa, K., J. Taskinen und R. Kostianen, *J. Chromatogr. B* **2000**, 749, 253–263.
- [141] Deng, Y., Zhang, H. und Henion, J., *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1432–1439.
- [142] Sheppard, R.L. und Henion, J., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2901–2907.
- [143] Bach, G.A. und Henion, J., *J. Chromatogr. B* **1998**, 707, 275–285.
- [144] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Giménez, E. und Barbosa, J., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1451–1456.
- [145] Liu, C.C., Jong, R. und Covey, T., *J. Chromatogr. A* **2003**, 1013, 9–18.
- [146] Rowena, M., Monton, N. und Terabe, S., *J. Chromatogr. A* **2004**, 1032, 203–211.
- [147] Simó, C., Elvira, C., González, N., Román, J.S., Barbas, C. und Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2004**, 25, 2056–2064.
- [148] Li, J., Thibault, P., Bings, N.H., Skinner, C.D., Wang, C., Colyer, C. und Harrison, J., *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3036–3045.
- [149] Li, J., Kelly, J.F., Chernushevich, I., Harrison, D.J. und Thibault, P., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 599–609.
- [150] Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M. und Nishioka, T., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2233–2239.
- [151] Li, J., Tremblay, T.-L., Wang, C., Attiya, S., Harrison, D.J. und Thibault, P., *Proteomics* **2001**, 1, 975–986.
- [152] Zhang, B., Foret, F. und Karger, B.L., *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2675–2681.

- [153] Yang, L., Lee, C.S., Hofstadler, S.A. und Smith, R.D., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4945-4950.
- [154] Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M. und Nishioka, T., *J. Proteome Res.* **2003**, 2, 488- 494.
- [155] Rejtar, T., Hu, P., Juhasz, P., Campbell, J.M., Vestal, M.L., Preisler, J. und Karger, B.L., *J. Proteome Res.* **2002**, 1, 171- 179.
- [156] Chen, Y.-R., Tseng, M.-C. und Her, G.-R., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1376-1382.
- [157] Pelzing, M. und Neusüß, C., *Electrophoresis* **2005**, im Druck.
- [158] Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G. und Wichtl, M.: In: Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G. und Wichtl, M.: *Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe Kommentar für Studierende*. **1991**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, A60.
- [159] Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G. und Wichtl, M.: In: *Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe Kommentar für Studierende*. **1991**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, P7.
- [160] Roth, H., Eger, K. und Troschütz, R.: *Arzneistoffanalyse*. **1997**, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm